

# **Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei***

vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
*doctor rerum naturalium*  
genehmigte Dissertation von

Diplom-Biochemiker Mark Günzel  
aus Lemgo

Referent: Prof. Dr. M. Engstler

Koreferent: Prof. Dr. G. Thiel

Tag der Einreichung: 16.7.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2010

Darmstadt 2010

Die vorliegende Arbeit wurde als Promotionsarbeit unter der Leitung von Herrn Professor Markus Engstler in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Boshart an der FU Berlin und der LMU München begonnen und in der Arbeitsgruppe von Professor Markus Engstler am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der technischen Universität Darmstadt angefertigt und am 16.07.2010 eingereicht.

Prüfungskommission:

Referent:	Prof. Dr. M. Engstler
Koreferent:	Prof. Dr. G. Thiel
Beisitzer:	Prof. Dr. C. Cardoso
Externer Beisitzer:	Prof. Dr. H. Kolmar

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Afrikanische Trypanosomen</b>	<b>3</b>
2.1.1.	Wirtschaftliche und epidemiologische Bedeutung	3
2.1.2.	Einordnung der afrikanischen Trypanosomen in die Familie der <i>Trypanosomatidae</i>	5
2.1.3.	Der Lebenszyklus von <i>T. brucei</i>	8
<b>2.2.</b>	<b>Besonderheiten der <i>Trypanosomatidae</i></b>	<b>10</b>
2.2.1.	GPI-verankerte Moleküle	10
2.2.2.	GPI-verankerte Oberflächenproteine in Trypanosomen	13
2.2.3.	Persistenz im Blutkreislauf von Säugetieren: Antigene Variation	15
<b>2.3.</b>	<b>Besonderheiten von <i>T. brucei</i></b>	<b>16</b>
2.3.1.	Der Zellzyklus von <i>T. brucei</i>	16
2.3.2.	Besonderheiten des Genoms von <i>T. brucei</i>	18
2.3.3.	Das Mitochondrium	19
2.3.4.	Glycosomen: kompartimentierte Glycolyse	19
2.3.5.	Das Zytoskelett von <i>T. brucei</i>	20
2.3.6.	Der sekretorische und endozytische Apparat	20
<b>2.4.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
3.1.1.	Chemikalien	28
3.1.2.	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	31
3.1.2.1.	Kulturmedien	31
3.1.2.2.	Puffer und Lösungen	31
3.1.3.	Verwendete Stämme und Zelllinien	33
3.1.3.1.	Bakterienstämme	33
3.1.3.2.	Trypanosomenstämme	33
3.1.4.	Technische Ausstattung	34
3.1.4.1.	Geräteausstattung	34
3.1.4.2.	Computerprogramme, Datenbanken und Internetplattformen	34

<b>3.2.</b>	<b>Methoden</b>	36
3.2.1.	<i>Trypanosoma brucei</i>	36
3.2.1.1.	Kultivierung von monomorphen Blutstromtrypanosomen	36
3.2.1.2.	Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen	37
3.2.1.3.	Transfektion von BSF	38
3.2.1.4.	Immunofluoreszenzanalysen	39
3.2.1.5.	Endozytose von biotinyliertem VSG	40
3.2.1.6.	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	40
3.2.2.	Biochemische Analysen von <i>T. brucei</i>	41
3.2.2.1.	Herstellung und Analysen von Gesamtproteinextrakten aus <i>T. brucei</i>	41
3.2.2.2.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>T. brucei</i>	42
3.2.2.3.	Nachweis von RNA	42
3.2.3.	Bakterielle Arbeitstechniken	44
3.2.3.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	44
3.2.3.2.	Plasmidisolierung	45
3.2.3.3.	Bakterienstabilate	46
3.2.4.	Molekularbiologische Arbeiten	46
3.2.4.1.	Agarose Gelelektrophorese	46
3.2.4.2.	Modifikation von DNA	46
3.2.4.3.	Polymerasekettenreaktion	47
3.2.4.4.	Analyse von DNA	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	49
<b>4.1.</b>	<b>Herstellung und Analyse von fluoreszierenden Markerproteinen</b>	49
4.1.1.	Ein GFP-markiertes verkürztes VSG zeigt eine intrazelluläre Lokalisation	51
4.1.2.	EP1:GFP ist ein geeigneter Reporter für das endosomale System	53
4.1.3.	VSG'Y' markiert die Zelloberfläche von lebenden Trypanosomen	56
4.1.3.1.	Insertion und Expression des VSG'Y' -Gens in einem anderen genomischen Kontext	58
4.1.3.2.	M1.2 <sup>tet</sup> <sub>K.117G</sub> ist induzierbar und ein zusätzliches VSG erreicht die pellikuläre Zelloberfläche	58
4.1.4.	Konstitutive Koexpression zweier Markerproteine in einer Zelllinie	59
4.1.4.1.	Expression von EP1:YFP im ribosomalen Lokus	61
4.1.4.2.	Expression von tVSG117:GFP außerhalb der <i>expression site</i>	62
4.1.4.3.	VSG'Y' gelangt auch bei mit niedrigen Expressionsniveaus auf die Zelloberfläche	63
4.1.4.4.	Überexpression von GPI-verankerten Proteinen führt zur Oberflächenexpression	64



4.1.5.	Markierung von Organellen mit spezifischen fluoreszierenden Proteinen	65
4.1.5.1.	Expression von VSG'Y' mit einer weiteren Resistenz	66
4.1.5.2.	Markerproteine des Transportweges vom ER bis zum Golgi-Apparat	66
4.1.5.2.1.	Das GFP-markierte Lektin <i>Tb</i> ERGIC-53 ist nahe des Golgi-Apparats lokalisierbar	66
4.1.5.2.2.	Das Transmembranprotein GntB56:YFP befindet sich in BSF im Golgi-Apparat	71
4.1.5.3.	p67WT:GFP ist in BSF ein Markerprotein für das Lysosom	72
4.1.5.4.	Herstellung von Zelllinien mit mehreren Markerproteinen	72
4.1.6.	RNA-Interferenz in Anwesenheit von fluoreszierenden GPI-verankerten Proteinen	74
4.1.6.1.	HSP60 ist essentiell für BSF	75
4.1.6.2.	Mangel an saurer Sphingomyelinase führt zum Verlust der typischen Morphologie von BSF	77
<b>4.2.</b>	<b>Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Reporterproteinen in monomorphen BSF</b>	81
4.2.1.	Der biosynthetische Transportweg von GPI-verankerten Proteinen	81
4.2.1.1.	<i>Tb</i> ERGIC-53 ist nicht essentiell an dem Transport von EP1:GFP beteiligt	82
4.2.1.2.	Die TRAPP-Untereinheit Bet3 ist essentiell und ist entscheidend für die Lokalisation von EP1:GFP im endosomalen System	84
4.2.1.3.	Die Depletion einer COP I-Untereinheit führt zur Delokalisation von EP1:GFP	88
4.2.1.4.	Der Transport von EP1:GFP in die Flagellartasche ist von <i>Tb</i> Rab11 abhängig	92
4.2.1.5.	N-Glycane sind essentiell für den Ausschluss von EP1:GFP von der Zelloberfläche	94
4.2.1.6.	Der <i>knock down</i> von <i>Tb</i> GEF2 führt zu einem pleiotropen, nicht eingrenzbaeren Phänotyp	99
4.2.2.	EP1:GFP im endozytotischen und exozytotischen Transportweg	102
4.2.2.1.	GPI-verankerte Proteine sammeln sich im Lumen der Flagellartasche an	102
4.2.2.2.	<i>Tb</i> Rab5b beeinflusst den Membranfluss an der Flagellartasche	106
4.2.2.3.	<i>Tb</i> Rab7-Mangel führt zur Lokalisation von EP1:GFP in einer tubulären Struktur	108
4.2.2.4.	<i>Tb</i> VPS11 reguliert den endozytotischen Transportweg bei den späten Endosomen	111
4.2.2.5.	Das Retromer ist am Transportweg von GPI-verankerten Proteinen beteiligt	114
<b>4.3.</b>	<b>Transport von GPI-verankerten Proteinen in pleomorphen Trypanosomen</b>	118
4.3.1.	Herstellung einer pleomorphen induzierbaren Zelllinie	119

4.3.2.	Konstitutive Expression von fluoreszierenden Proteinen in pleomorphen Trypanosomen	120
4.3.2.1.	Expression von VSG'Y' in pleomorphen Trypanosomen	121
4.3.2.2.	Expression von EP1:GFP in pleomorphen Trypanosomen	121
4.3.2.3.	Herstellung einer induzierbaren pleomorphen Zelllinie mit konstitutiver Expression von EP1:YFP	121
4.3.2.4.	Expression des trunkierten VSG117:GFP in pleomorphen Trypanosomen	122
4.3.2.5.	Induzierbare RNA-Interferenz in pleomorphen Trypanosomen	123
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	124
<b>5.1.</b>	<b><i>In silico</i>-Identifizierung von Regulatoren des intrazellulären Transportsystems</b>	124
<b>5.2.</b>	<b>Auswahl des GPI-verankerten Fusionsproteins</b>	134
<b>5.3.</b>	<b>Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Protein in <i>T. brucei</i></b>	139
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	157
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	179
<b>8.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	181
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	182

# 1. Zusammenfassung

Der Parasit *T. brucei* besitzt nicht nur eines der effizientesten Proteintransportsysteme, sondern zeichnet sich auch dadurch aus, dass eine Vielzahl von Transportwegen, welche die Betrachtung des Säugersystems so erschweren, nicht existieren. Zusammen mit der strengen Zellarchitektur, welche der Einzeller aufweist, bietet sich hier die Möglichkeit, das Trafficking von Proteinen und im besonderen das von GPI-verankerten Proteinen näher zu charakterisieren. Darüberhinaus durchläuft *T. brucei* auch mehrere Lebensstadien, welche unterschiedliche Anforderungen an das Endomembransystem stellen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Analyse der Transportwege in *T. brucei* in mehreren Lebensstadien zu und durch die Kombination von RNA-Interferenz mit der Expression fluoreszierender Reporterproteine zu vereinfachen.

Das Überleben von *T. brucei* im Blutstrom des Vertebratenwirtes stellt spezifische und hohe Anforderungen an den Parasiten. Die Aufrechterhaltung eines dichten VSG-Mantels verlangt effizienten Transport von GPI-verankerten Proteinen, welcher in diesem Ausmaß in anderen Modellorganismen nicht gegeben ist.

Zur Analyse der Sortierung der GPI-verankerten Proteine während des intrazellulären Transportes nach Neusynthese bzw. beim Recycling wurden fluoreszierende Markerproteine gesucht, welche als Reporter dienen können. Mit EP1:GFP steht jetzt ein Reporterprotein zur Verfügung, dessen intrazelluläre Lokalisation der von VSG entspricht, wohingegen ein modifiziertes VSG aufgrund seiner stark beeinträchtigten intrazellulären Lokalisation nur bedingt für diese Anwendung geeignet ist. Das selbstfluoreszierende VSG'Y' hingegen weist die intrazelluläre Lokalisation und das Transportverhalten als VSG auf, allerdings wird die Fluoreszenz bei intrazellulärer Lokalisation gelöscht.

Mit weiteren fluoreszierenden Kompartimentsmarkern für Golgi-Apparat, Lysosom und ERGIC wurde eine breite Grundlage gelegt zur Durchführung eines umfassenden Screenings.

Der Transportweg von EP1:GFP wurde durch Anwendung von RNA-Interferenz gerichtet gegen mögliche Regulatoren des Transportes charakterisiert. Diese Regulatoren wurden nach aktueller Kenntnislage der Transportwege in Hefe und Säugerzellen ausgesucht. Hauptsächlich handelt es sich um postulierte Hüllproteine von Vesikeln ( $\alpha$ COP, schwere Kette von Clathrin, VPS29), Untereinheiten von Tetheringkomplexen (bet3, VPS11) und kleine GTPasen (verschiedene Rabs). Hinzu kamen Proteine, welche mit der N-Glycosylierung von Proteinen zusammenhängen oder welche mit der Glycosylierung interagieren könnten (STT3, ERGIC-53).

Durch die Durchführung dieses Assays konnten spezielle Abweichungen zwischen EP1:GFP und VSG bei den späten Endosomen sowie beim Transport zum Golgi-Apparat festgestellt werden. Während bei Störung des Transportweges von späten Endosomen

zum Golgi-Apparat eine Trennung von EP1:GFP und VSG bewirkt, erfolgt der Transport von membranverankerten Proteinen und GPI-verankerten Proteinen zwischen ER und Golgi durch unterschiedliche Vesikel. Der strukturierte Zellaufbau von *T. brucei* vereinfacht hierbei die konkreten Aussagen zur intrazellulären Lokalisation und die direkte Darstellung der sortierten GPI-verankerten Proteine.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Charakterisierung dieser Transportwege in pleomorphen Trypanosomen mit Schwerpunkt auf das bislang nur wenig charakterisierte *short stumpy* Lebensstadium zu ermöglichen. Der Zugang von Nicht-VSGs auf die pellikulare Zellmembran in diesem Lebensstadium und sowie die Präadaption auf das folgende prozyklische Lebensstadium weisen darauf hin, dass das Trafficking von GPI-verankerten Proteinen hier anderen Bedingungen unterliegt und sich deshalb von dem Trafficking im *long slender* Blutstromstadium unterscheidet. Hierfür konnten die entscheidenden Grundlagen geschaffen werden, indem eine induzierbare Zelllinie sowie verschiedene Zelllinien mit der Expression von geeigneten Reporterproteinen hergestellt wurden.

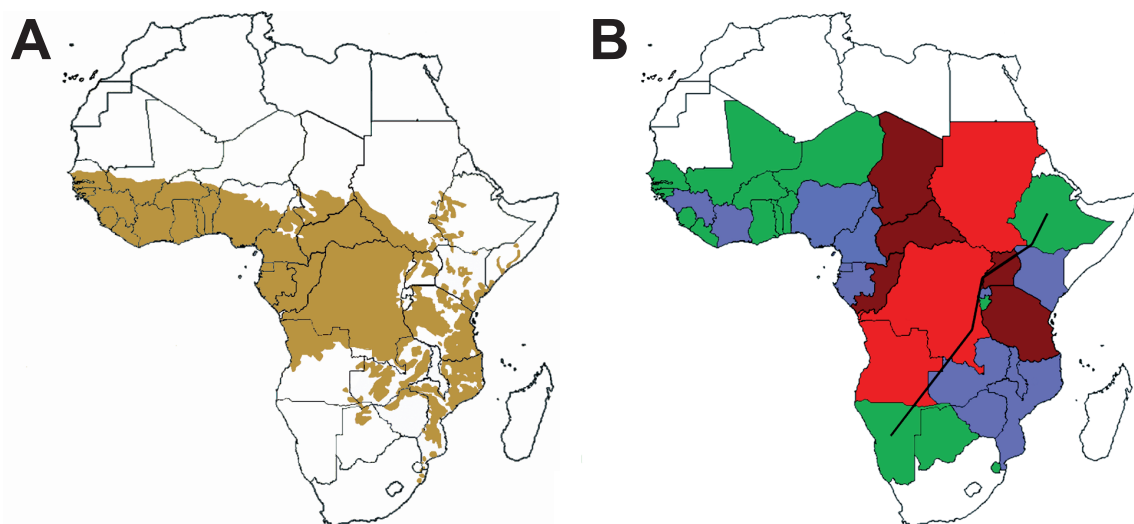
## 2. Einleitung

### 2.1. Afrikanische Trypanosomen

#### 2.1.1. Wirtschaftliche und epidemiologische Bedeutung

Die durch *T. brucei* verursachte afrikanische Schlafkrankheit (HAT) gehört zu den vernachlässigten tropischen Krankheiten, welche im Vergleich zu den drei Krankheiten HIV/AIDS, Tuberkulose und Malaria nur wenig beachtet werden. Die Weltgesundheitsorganisation WHO teilt diese Krankheiten in zwei Gruppen nach möglichen Gegenmaßnahmen ein. Während die Krankheiten der ersten Gruppe ähnliche Behandlungen und Gegenmaßnahmen erfordern, sind zur Bekämpfung der Krankheiten der zweiten Gruppe sehr spezifische Gegenmaßnahmen notwendig. In dieser Gruppe finden sich vor allem die durch Kinetoplastiden verursachten Krankheiten wie die afrikanische Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei*), die Chagas Krankheit (*Trypanosoma cruzi*) und Leishmaniose (*Leishmania*). Die endemische Verbreitung der Krankheit setzt die Verbreitung durch die Tsetse-Fliege (*Glossina*) voraus (Abb. 1).

Die Relevanz von *T. brucei* ergibt sich vor allem in der Kombination aus der Erkrankung der Menschen mit dem wirtschaftlichem Schaden durch die Infektion der Nutztiere im strukturell und ökonomisch ohnehin schwachen sub-saharischen Afrika. In dieser Region leben etwa 60 Millionen Menschen unter dem Risiko der Infektion, welche ohne Behandlung tödlich verläuft (WHO 1998). Im Verlauf der letzten 15 Jahre gab es durchschnittlich etwa 25.000



**Abb. 1: Verbreitungsgebiet der Tsetse-Fliege (*Glossina*) und endemische Verbreitung der tropischen Schlafkrankheit in Afrika:** A) ■ Verbreitungsgebiet der Tsetse-Fliege nach IAEA Bulletin 42/1, 2000 ([www.iaea.org](http://www.iaea.org)); B) Durchschnittliche jährliche Anzahl an neu registrierten Infektionen der Schlafkrankheit in den Jahren 1997-2006: ■ keine Neuinfektionen / keine Registrierung; ■ unter 100 jährliche Neuinfektionen; ■ zwischen 100 und 1.000 jährliche Neuinfektionen; ■ über 1.000 jährliche Neuinfektionen (nach: Simarro *et al.*, 2008); die Linie kennzeichnet die Trennung der für *T. brucei gambiense* (westlich der Linie) von den für *T. brucei rhodesiense* (östlich der Linie) endemischen Regionen.

diagnostizierte Neuinfektionen pro Jahr mit einer geschätzten gesamten Neuinfektionszahl von 300.000 Fällen einschließlich der Dunkelziffer (WHO 2006). Die Zahl der Neuinfektionen pro Jahr ist seit 1998 mit etwa 38.000 neuen Fällen auf 17.600 im Jahr 2004 gesunken (WHO 1998, 2006). Gleichzeitig wurde die Anzahl der getesteten Personen verdoppelt. Zum Teil ist diese Tendenz auf die verbesserte Infrastruktur und stabilere politische Situation in den betroffenen Gebieten während dieses Zeitraums zurückzuführen.

Dennoch stellt die Krankheit nach wie vor ein großes Risiko für die betroffenen Menschen dar. Im Fall des epidemischen Ausbruchs der Krankheit wie beispielsweise 2004 in der Demokratischen Republik Kongo erreichte die Infektionsrate in einigen Dörfern 50%. In diesen Fällen wurde die Schlafkrankheit zusammen mit HIV/AIDS zur häufigsten Todesursache.

Im Verlauf der Krankheit kommt es zu charakteristischen Fieberschüben und anschließendem scheinbaren Abklingen der Infektion aufgrund der antigenen Variation. Die Krankheit verläuft in zwei Phasen. In Phase I sind die Trypanosomen im Blutkreislauf nachweisbar. Mit zunehmender Parasitämie überwinden die Parasiten die Blut-Hirn-Schranke und sind in der Cerebrospinalflüssigkeit nachweisbar. Die Medikamente Suramin und Pentamidin können nur in der ersten Phase der Erkrankung eingesetzt werden, da sie nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Nok 2003). Für das spätere Stadium der Krankheit stehen nur das Arsenderivat Melarsoprol sowie im Fall von Infektionen durch *T. brucei gambiense* seit 2001 Eflornithin zur Verfügung (Chappuis *et al.*, 2005; Balasegaram *et al.*, 2006).

Außerdem befallen afrikanische Trypanosomen eine Vielzahl von Nutz- und Wildtieren, wobei letztere ein für den Menschen unkontrollierbares Repertoire an Parasiten darstellen. Neben den drei Unterarten *T. brucei gambiense*, *rhodesiense* und *brucei* sind die Arten *T. congolense* und *T. vivax* die hauptsächlichen Erreger der Rinderkrankheit Nagana, wie die Trypanosomiasis bei Tieren auch genannt wird. Insgesamt können wegen der Verbreitung von Trypanosomen etwa 20 Millionen km<sup>2</sup> und somit etwa 17% der Fläche von Afrika nicht als Weideland genutzt werden. Für die Bevölkerung dieser Region ergibt sich ein Teufelskreis aus tödlicher Infektion und wirtschaftlicher Not, da die Nutztiere der dortigen Subsistenzwirtschaft an Nagana erkranken. Der jährliche Schaden an der Agrarindustrie der betroffenen Länder wird auf etwa 1300 Millionen Dollar geschätzt (Shaw 2004).

Das epidemiologische Programm der WHO mit Behandlung und Registrierung der Krankheitsfälle wird durch die *Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication Campaign* (PATTEC) ergänzt, welche eine Initiative der afrikanischen Regierungen ist und die Ausrottung der Tsetse-Fliege durch Fliegenfallen, Insektizide und Aussetzung unfruchtbarer männlicher Tsetse-Fliegen zum Ziel hat (Kabayo 2002). Modellprojekt dieser Initiative ist die erfolgreiche Eliminierung der Tsetse-Fliege von der Insel Unguja in Zanzibar 1997 (Vreysen *et al.*, 2000).

### 2.1.2. Einordnung der afrikanischen Trypanosomen in die Familie der *Trypanosomatidae*

Die afrikanischen Trypanosomen gehören zu dem Genus *Trypanosoma* der Familie *Trypanosomatidae*. Alle Vertreter dieser Gattung sind Einzeller und leben parasitär, wobei das Wirtsspektrum des Genus außerordentlich breit ist und weite Bereiche der Vertebraten abdeckt. Die ersten Arten von *Trypanosoma* wurden 1841 in Forellen von Gabriel Valentin entdeckt und 1843 durch David Gruby als "*Trypanosoma*" benannt. Als erster Vertreter der afrikanischen Trypanosomen wurde *T. gambiense* 1901 von Robert Micheal Forde in Gambia entdeckt und 1902 durch Joseph Everett Dutton beschrieben (de Raadt 2005). Viele Trypanosomen vollziehen in ihrem Lebenszyklus einen Wechsel zwischen dem Invertebratenvektor und dem Säugetierwirt und durchlaufen hierbei unterschiedliche Lebensstadien. Sie unterscheiden sich zum Teil stark bezüglich ihrer Wirtsspezifität und der Anforderungen an den Invertebratenvektor. Grundsätzlich wird zwischen den Übertragungswegen durch Kot (*Stercoraria*) und Speichel (*Salivaria*) unterschieden (Hoare 1972). Zu den bekanntesten Vertretern der *Stercoraria* gehören *T. cruzi* (Tyler und Engman 2001), *T. lewisi*, *T. theileri* und *T. conorhini* (Bishop 1967).

Afrikanische Trypanosomen sind *Salivaria* und werden durch die Tsetse-Fliege (Gattung *Glossina* sp.) übertragen. Hierbei werden vier Subgenera unterschieden (Tabelle 1). Einige Publikationen nennen als fünften Subgenus *Tejeraia* mit *T. rangeli*. Diese Spezies ist allerdings nur unzureichend charakterisiert worden. Da sie in Lateinamerika verbreitet ist und ebenso wie *T. cruzi* Raubwanzen der Gattung *Triatoma* als Invertebratenvektor nutzt, wird trotz der Übertragung durch den Biss des Insektenvektors eine nähere Verwandtschaft zu den *Stercoraria* diskutiert (Añez 1982; Grisard 2002).

Die weiteren vier Subgenera *Dutonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas* und *Trypanozoon* umfassen Trypanosomenarten, welche nach heutigem Kenntnisstand alle aus Afrika stammen. Eines der Hauptunterscheidungsmerkmale für diese Subgenera sind die Lebensstadien der Trypanosomen im Invertebratenvektor mit ihren entsprechenden Lokalisationen in Saugrüssel, Darm und Speicheldrüsen der Fliegen.

Das Subgenus *Dutonella* mit *T. vivax* infiziert lediglich den Saugrüssel der Insekten und wird rein mechanisch übertragen. Diese im Vergleich zu den anderen Subspezies sehr einfache Infektion des Invertebraten durch *T. vivax* führt zu dem höchsten Anteil an infizierten Fliegen von ca. 70% mit Infektionsraten von 100% unter Laborbedingungen (Jordan 1976). Dies trug vermutlich zu der Verbreitung und dem Entstehen einer *T. vivax* Population in Südamerika auch ohne Tsetse-Fliege bei, nachdem infiziertes Vieh aus Afrika nach Südamerika exportiert worden war (Jones und Dávila 2001). Die Übertragung findet hier primär durch Fliegen der Gattungen *Tabanidae* und *Stomoxys* statt. Die afrikanische Population von *T. vivax* tritt allerdings nur in Gebieten auf, in denen auch die Tsetse-



**Tabelle 1: Übersicht über die Subgenera der afrikanischen Trypanosomen (*Salivaria*)**

Subgenera der afrikanischen Trypanosomen ( <i>Salivaria</i> )	wichtigste Vertreter	Infektion der Fliege
<i>Duttonella</i> ( <i>Vivax</i> -Gruppe)	<i>T. vivax</i> <i>T. uniforme</i>	Saugrüssel
<i>Nannomonas</i> ( <i>Congolense</i> -Gruppe)	<i>T. congolense</i> <i>T. simiae</i> <i>T. godfreyi</i>	Saugrüssel, Darm
<i>Pycnomonas</i>	<i>T. suis</i>	Saugrüssel, Darm
<i>Trypanozoon</i> ( <i>Brucei</i> -Gruppe)	<i>T. brucei gambiense</i> <i>T. brucei rhodesiense</i> <i>T. brucei brucei</i> <i>T. brucei evansi</i> <i>T. brucei equiperdum</i>	Saugrüssel, Darm, Speicheldrüsen
<i>Tejeraia</i> *	<i>T. rangeli</i>	- / (Transmission über <i>Triatoma</i> )

\* Zuordnung zu den *Salivaria* umstritten

Fliege lebt. *T. vivax* befällt vor allem Rinder, ist allerdings in geringerem Ausmaß auch in Wildtieren nachgewiesen worden.

Das zweite Subgenus *Nannomonas* umfasst unter anderem die Arten *T. congolense*, *T. simiae* und *T. godfreyi*. Die Vertreter dieses Subgenus infizieren den Saugrüssel und den Verdauungstrakt der Invertebratenvektoren. Während *T. vivax* vor allem Rinder infiziert, ist *T. congolense* in einer Vielzahl von Säugetierwirten nachweisbar (Jordan 1976; Gibson 2003). Trotz der geringeren Transmissionsrate von *T. congolense* im Vergleich zu *T. vivax* (Woolhouse *et al.*, 1994; Moloo *et al.*, 1999) ist die geographische Verbreitung von *T. congolense* mit der von *T. vivax* vergleichbar (Msangi *et al.*, 1998) und hat durch das breitere Wirtsspektrum immense Auswirkungen auf die wirtschaftliche Entwicklung der betroffenen Regionen. In den letzten Jahren traten auch zunehmend Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente bei *T. congolense* auf (Geerts *et al.*, 2001). *Trypanosoma simiae* und *T. godfreyi* infizieren speziell Schweine (Gibson 2003).

Als drittes Subgenus der *Salivaria* gilt *Pycnomonas* mit *T. suis* als bislang einzigem und wenig charakterisiertem Vertreter. Bislang ist lediglich die phylogenetische Verwandtschaft zu den Arten des Subgenus *Nannomonas* nachgewiesen worden (Gibson *et al.*, 2001).

Das vierte Subgenus *Trypanozoon* zeichnet sich vor allem durch die Infektion der Speicheldrüsen des Invertebratenvektors aus und besitzt somit die höchste Vektorspezifität der Subgenera. Die Trypanosomen durchlaufen in der Fliege einige komplexe Lebensstadien während der Migration vom Darm der Fliegen in die Speicheldrüsen. Die wichtigsten Vertreter des Subgenus bilden die sogenannte *Brucei*-Gruppe: *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense* und *T. brucei brucei*. Die beiden ersten sind humanpathogen und führen zu den beiden Varianten der afrikanischen Schlafkrankheit.



*Trypanosoma brucei gambiense* kommt fast ausschließlich in Menschen vor und konnte ansonsten nur aus Schafen und Schweinen isoliert werden (Simo *et al.*, 2006). Für Schweine ist der Erreger allerdings nicht tödlich (Penchenier *et al.*, 2005). Auf *T. brucei gambiense* gehen ca. 95% der diagnostizierten Fälle der Schlafkrankheit zurück, welche sich durch einen jahrelangen, chronischen Verlauf auszeichnen mit nur leichten Symptomen in den ersten Monaten der Infektion (Checchi *et al.*, 2008).

Im Vergleich hierzu ist *T. brucei rhodesiense* wesentlich aggressiver. Die ersten Symptome der Infektion beim Menschen zeigen sich bereits nach ein bis drei Wochen, und das zentrale Nervensystem der Erkrankten kann bereits nach einem Monat in Mitleidenschaft gezogen werden. Zudem ist bei einer Infektion durch *T. brucei rhodesiense* meist eine höhere Parasitämie zu beobachten. Außerdem hat *T. brucei rhodesiense* ein breiteres Säugetierwirtsspektrum, weshalb die Maßnahmen zur Eindämmung der Krankheit auch die Kontrolle der Tsetse-Fliegen-Population (Lancien 1991) sowie die Evakuierung der gefährdeten Bevölkerung aus den betroffenen Gebieten beinhalten (Welburn *et al.*, 2001a). Die Verbreitungsgebiete beider Unterarten sind bislang getrennt (*T. brucei gambiense* in Westafrika, *T. brucei rhodesiense* in Ostafrika). Durch Flüchtlingsmigrationen und Ausweitung der von *T. brucei rhodesiense* betroffenen Gebiete ist die Gefahr einer Überlappung der Verbreitungsgebiete gegeben (Picozzi *et al.*, 2005). Eine solche Überlappung der endemischen Regionen würde eine deutlich Umstellung der diagnostischen und therapeutischen Verfahren erfordern.

*Trypanosoma brucei brucei* als dritte Unterart von *Trypanozoon* gilt neben *T. congolense* und *T. vivax* als Erreger der Rinderseuche Nagana. *Trypanosoma brucei brucei* ist nicht humanpathogen, da es im menschlichen Blut innerhalb von zwei Stunden durch den *trypanosome lytic factor* (TLF) getötet wird (Hajduk *et al.*, 1989). Als lytischer Faktor ist das Apolipoprotein L1 der HDL-Partikel identifiziert worden (Rifkin 1978; Kay *et al.*, 1982; Vanhamme *et al.*, 2003; Vanhollenbeke *et al.*, 2007). Die Anfälligkeit für diesen lytischen Faktor wird in *T. brucei rhodesiense* durch das *serum resistance-associated* (SRA) Protein ausgeschaltet (Xong *et al.*, 1998). Das SRA-Protein ist ein verkürztes VSG und wird in der *expression site* codiert. Es gelangt an die Zelloberfläche und verbleibt im späten endosomalen Kompartiment, wo es ApoL1 inaktiviert. SRA wird durch PCR zur Unterscheidung zwischen *T. brucei brucei* und *T. brucei gambiense* von *T. brucei rhodesiense* genutzt (Welburn *et al.*, 2001b). Die Resistenz von *T. b. gambiense* gegen TLF ist bislang noch nicht aufgeklärt worden und beruht nicht auf SRA.

Das Subgenus *Trypanozoon* umfasst noch zwei weitere Unterarten, welche erst nach neueren Erkenntnissen als Unterarten von *T. brucei brucei* erkannt wurden (Lai *et al.*, 2008). *Trypanosoma brucei evansi* und *T. brucei equiperdum* zeichnen sich durch einen partiellen bzw. vollständigen Verlust der mitochondrialen DNA aus. *T. evansi* gilt im Allgemeinen als Erreger der Krankheit Surra und ist aufgrund der rein mechanischen Übertragung durch

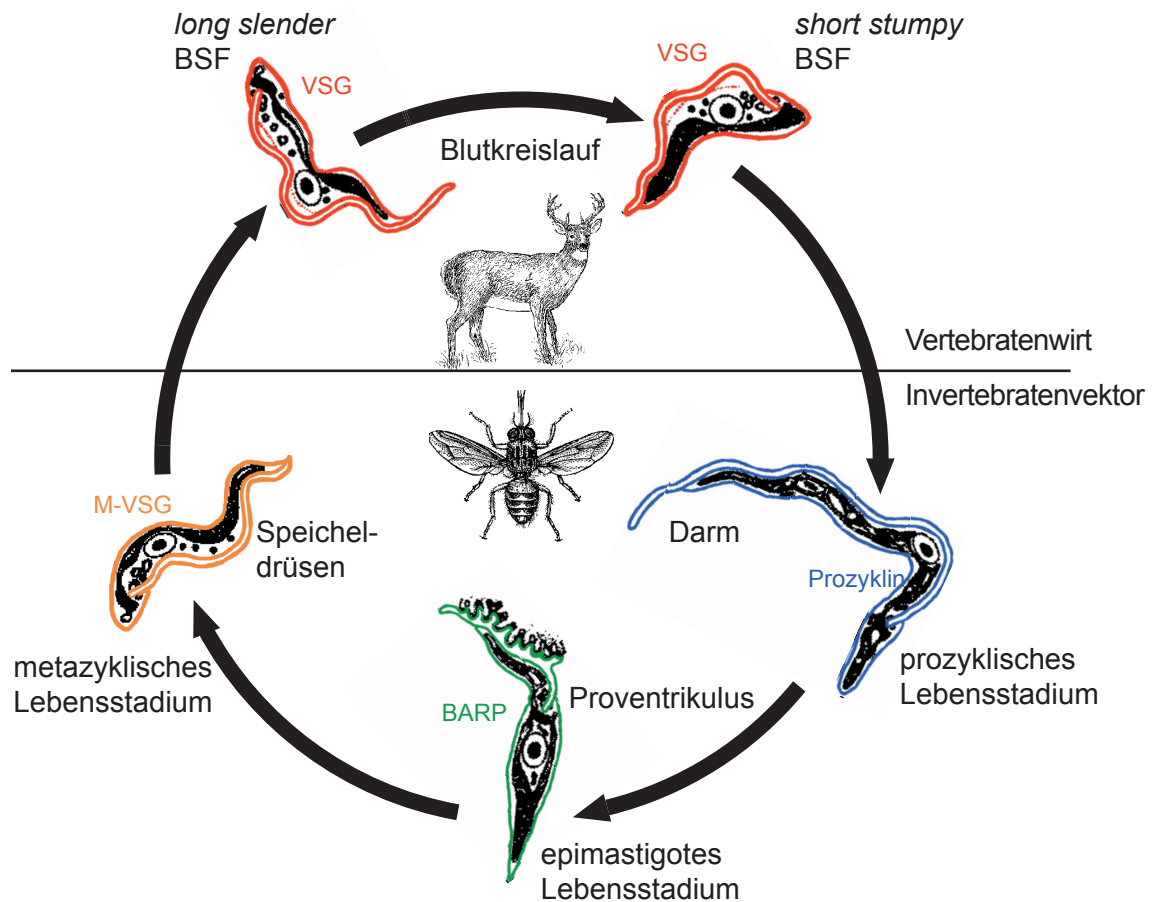
blutsaugende Insekten weit verbreitet. Vor allem in Süd- und Zentralamerika, in Afrika und in Asien werden Pferde, Rinder, Kamele und Schweine befallen. Der wirtschaftliche Schaden in den betroffenen Regionen ist signifikant (Reid 2002). In Indien ist es in einigen Fällen zu einer Infektion von Menschen gekommen (Joshi *et al.*, 2005; Shegokar *et al.*, 2006). *Trypanosoma equiperdum* tritt als Erreger der Beschälseuche (Dourine) in Pferden und Eseln auf und wird bei der Beschälung übertragen, ohne dass ein Invertebratenvektor involviert ist (Claes *et al.*, 2005).

### **2.1.3. Der Lebenszyklus von *T. brucei***

Der Lebenszyklus von *T. brucei* wird durch den Wechsel zwischen extremen Milieus geprägt, die hohe Anforderungen an den Einzeller stellen. Gleichzeitig ist *T. brucei* als obligater Parasit jedoch von diesen Lebensumgebungen abhängig. Der Wechsel zwischen dem Blutstrom des Säugetierwirts und dem Verdauungstrakt und den Speicheldrüsen des Insektenvektors, der Tsetse-Fliege (*Glossina*), wird durch massive zellbiologische Änderungen bedingt (Vickerman *et al.*, 1988). Die Expression unterschiedlicher Oberflächenproteine zeigt deutlich die Anpassung des Parasiten an die spezielle Umweltbedingungen (Abb. 2). Der Lebenszyklus von *T. brucei* ist gleichzeitig eine Abfolge von proliferierenden und nicht-proliferierenden Lebensstadien. Bei der Differenzierung zu den einzelnen Lebensstadien spielen sowohl das unterschiedliche Milieu (pH, Temperatur) als auch die unterschiedlichen Anforderungen durch den jeweiligen Wirt eine Rolle (Immunsystem, Energiequelle).

Durch den Stechbiss der Tsetse-Fliege gelangen infektiöse, nichtproliferierende metazyklische Trypanosomen in das subcutane Gewebe des Vertebratenwirts (Vickerman *et al.*, 1988). Mit der Differenzierung zu *long slender* BSF (BSF) treten die Parasiten wieder in den Zellzyklus ein. Durch die hierbei entstehenden Stoffwechselprodukte und Zellbruchstücke rufen sie beim Vertebratenwirt eine lokale Entzündung ("Trypanosomenschanke") hervor (Barry und Emery 1984).

Das BSF-Lebensstadium von *T. brucei* ist recht umfassend untersucht worden und weist einige Besonderheiten auf. Das Überleben der Parasiten im Blutstrom ohne die Invasion in Zellen des Säugetierwirts erfordert eine Abwehrstrategie gegenüber dem Immunsystem des Säugetierwirts, welchem die Zellen fortwährend ausgesetzt sind. Die Abschirmung der Zellen mit einem einzigen Oberflächenprotein, dem variablen Oberflächenglycoprotein VSG, führt zu der ausschließlichen Exposition von VSGs als Antigene gegenüber dem Immunsystem. Durch den Wechsel des VSGs bei der "antigenen Variation" wird die Persistenz der Population in diesem Lebensstadium ermöglicht. BSF verfügen nur über ein rudimentäres Mitochondrium und eine stark eingeschränkte Atmungskette. Zur ATP-Erzeugung dient ausschließlich die Glucose aus dem Blut des Wirtes, welche durch die ersten Enzyme der Glycolyse in den Glycosomen zu Pyruvat abgebaut wird (Opperdoes und Borst 1977; Opperdoes *et al.*, 1984).



**Abb. 2: Lebenszyklus von *T. brucei*:** Übersicht über die einzelnen Lebensstadien von *T. brucei* mit der jeweiligen Lokalisation im Wirt. Die für die einzelnen Lebensstadien spezifischen Oberflächenproteine sind farbig beschriftet. Modifiziert nach Vickermann 1988.

*Long slender* BSF sekretieren den sogenannten *stumpy induction factor* (SIF), der die Differenzierung eines Teils der Population zu sogenannten *short stumpy* BSF bewirkt (Reuner *et al.*, 1997; Vassella *et al.*, 1997). Diese Differenzierung führt mit einigen morphologischen und metabolischen Änderungen zur Präadaptation an den Invertebratenvektor und zum Zellzyklusarrest (Tyler 1997).

Nach der Aufnahme der Trypanosomen mit der Blutmahlzeit gelangen die Trypanosomen in den Verdauungstrakt der Tsetse-Fliegen. Der Temperaturwechsel aufgrund des Übergangs in den poikilothermen Invertebratenwirt induziert die Expression des lebensstadienspezifischen Oberflächenproteins Prozyklin (Engstler und Boshart 2004). Im Verlauf der Transformation zu prozyklischen Trypanosomen werden die VSG-Moleküle durch Metalloproteasen und Phospholipasen entfernt (Ziegelbauer *et al.*, 1993; Grandgenett *et al.*, 2007). Gleichzeitig werden unterschiedliche Isoformen der Prozyklone in spezifischer Reihenfolge exprimiert und bilden einen neuen Proteinmantel (Roditi *et al.*, 1998).

Prozyklische Trypanosomen gewinnen ihre Energie vor allem durch den Abbau von Prolin und anderen Aminosäuren und verfügen über ein aktives Mitochondrium sowie eine vollständige Atmungskette (Matthews 2005).

Vom Darm der Tsetse-Fliege aus wandern die Trypanosomen zu den Speicheldrüsen und treten dort in das epimastigote Lebensstadium ein. Epimastigote Trypanosomen lagern sich an die Mikrovilli der Endothelzellen der Speicheldrüsen an und vermehren sich. In den Speicheldrüsen der Tsetse-Fliege kann es zur Meiose kommen (Gibson *et al.*, 2008; Morrison *et al.*, 2009; Peacock *et al.*, 2009).

Nach Ablösung von den Endothelzellen differenzieren die Zellen weiter zu metazyklischen Trypanosomen, welche wiederum zellzyklusarretiert sind. Dieses Lebensstadium zeichnet sich bereits durch die Expression von VSGs aus. Allerdings werden diese metazyklischen VSG-Gene (M-VSGs) monocistronisch transkribiert (Alarcon *et al.*, 1994) und besitzen eine eigene *expression site*. Diese *expression sites* haben sich vermutlich aus der *expression site* des Blutstromstadiums entwickelt, da sich strangaufwärts des M-VSG-Gens einige ESAGs in der nichttranskribierten Region befinden (Barry *et al.*, 1998). Das Repertoire an metazyklischen VSGs ist mit 12-27 Genen wesentlich begrenzter als das der VSGs der Blutstromform-Trypanosomen (Esser *et al.*, 1982; Turner *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 1998). Metazyklische Trypanosomen exprimieren ein einziges, in einer Population von Zelle zu Zelle verschiedenes M-VSG und ermöglichen so auch die Infektion von bereits durch BSF-VSGs präimmunisierten Wirten.

## **2.2. Besonderheiten der *Trypanosomatidae***

### **2.2.1. GPI-verankerte Moleküle**

Das variable Oberflächenglycoprotein VSG von *T. brucei* ist durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Zellmembran befestigt. Die GPI-Verankerung von Proteinen ist zeitgleich an mehreren Proteinen unterschiedlicher Spezies entdeckt worden. Zu diesen GPI-verankerten Proteinen gehören die Acetylcholinesterase in *Homo sapiens* (Roberts und Rosenberry 1985) und *Torpedo* (Futerman *et al.*, 1985), THY-1 in *Rattus norvegicus* (Tse *et al.*, 1985) und VSG in *T. brucei* (Ferguson *et al.*, 1985). In höheren Eukaryoten sind etwa 2% der Proteine GPI-verankert, welche etwa 0,5% des Gesamtproteins ausmachen. Bei angenommenen 23.000 Genen des humanen Genoms wird die Anzahl von GPI-verankerten Proteinen auf 460 geschätzt (Elortza *et al.*, 2006). VSG macht insgesamt 10% des Gesamtproteins von *T. brucei* aus. Dieser hohe Anteil ermöglichte die Aufreinigung und somit die Aufklärung der Struktur durch chemische und enzymatische Fragmentierung (Ferguson *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1988). Weitere mittlerweile bekannte GPI-verankerte Proteine sind die alkalische Phosphatase AP, das Prionenprotein PrP<sup>c</sup>, der *decay acceleration factor* DAF sowie die Glucanosyltransferase Gas1 (*S. cerevisiae*).

Der grundsätzliche Aufbau von GPI-Ankern ist in der eukaryotischen Domäne konserviert (McConville und Ferguson 1993). Über eine Amidbindung ist Ethanolamin an die endständige Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure gebunden. An das Ethanolamin sind über

eine Phosphatgruppe mehrere Glycosylreste gebunden, welche in einem gewissen Ausmaß variieren, im Grundaufbau allerdings bei Typ I-GPI-Ankern aus zwei durch  $\alpha$ -glycosidische Bindungen verbundene Mannosen, einem Glucosamin sowie dem Inositolring des Phosphatidylinositols bestehen (Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcNa1-6PI). Die anderen beiden bekannten Typen von GPI-Ankern (Typ II und Hybrid-GPIs) kommen vor allem in *Leishmania* und *Tetrahymena* vor und unterscheiden sich hinsichtlich der glycosidischen Verknüpfung der beiden Mannosen (McConville und Ferguson 1993).

Die Biosynthese von GPI-Ankern beginnt durch die Übertragung von N-Acetyl-Glucosamin auf Phosphatidyl-Inositol (Güther und Ferguson 1995) durch eine N-Acetylglucosaminyltransferase (Izquierdo *et al.*, 2009). Während der weiteren Biosynthese kann der Inositolring palmitoyliert und wieder deacyliert werden. Die beiden Reaktionen stehen in einem Fließgleichgewicht zueinander (Güther *et al.*, 1994), während die Übertragung von drei Mannoseresten stattfindet. Die Kondensation von Ethanolamin an die dritte Mannose geschieht allerdings nur mit acyliertem Inositolring.

Nach Abspaltung der Fettsäure am zweiten Kohlenstoffatom des Glycerols werden im Blutstromstadium von *T. brucei* die Fettsäurereste ersetzt und ausgetauscht, so dass der GPI-Anker statt zweier Stearoylreste zwei Myristoylreste enthält. Nach endgültiger Deacylierung des Inositolringes wird dieser Anker im ER dann unter Abspaltung der C-terminalen Signalsequenz des Präproteins mit der Carboxygruppe des nun endständigen Aspartat oder Serin kondensiert. Anschließend findet im Golgi-Apparat noch die Modifizierung des ersten Mannosylrestes durch  $\alpha$ -Galactosyl-Transferasen statt.

In Säugerzellen unterscheidet sich die Biosynthese insofern, dass Glucosamin-Phosphatidyl-Inositol palmitoyliert wird und erst nach Übertragung des GPI-Ankers auf das Präprotein wieder entfernt wird. Außerdem wird der erste Mannosylrest sofort mit Ethanolamin modifiziert (Puoti und Conzelmann 1993). Ein Austausch der Fettsäurereste ist bislang nicht festgestellt worden und findet außer bei einigen Kinetoplastiden (Ralton und McConville 1998) noch in der Hefe statt (Reggiori *et al.*, 1997).

Die Modifizierung des GPI-Ankers unterscheidet sich abhängig der einzelnen Lebensstadien (Paturiaux-Hanocq *et al.*, 1997). Im Blutstromstadium werden die drei Mannosen des GPI-Ankers mit Galactosen im ER und im Golgi-Apparat modifiziert, wobei die Anzahl der Galactosen mit der Struktur der C-terminalen Domäne des VSGs korreliert (Mehlert *et al.*, 1998a).

Im prozyklischen Stadium hingegen wird der Inositolring nicht deacyliert. Zwei Deacylasen aus *T. brucei* sind kloniert und charakterisiert worden (Güther *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2006), wobei die mRNA-Stabilität der zweiten Deacylase eine stadienspezifische Regulation aufweist und im prozyklischen Stadium herunterreguliert ist (Hong *et al.*, 2006). Wie

im Blutstromstadium wird die Acylierung am Kohlenstoffatom 2 des Phosphatidylrestes durch eine Phospholipase A2 abgespalten. Anders als im Blutstromstadium findet allerdings keine weitere Veränderung der Phosphatidyleinheit statt, so dass der GPI-Anker mit dem C1-Stearoylrest und dem am Inositol gebundenen Palmitoylrest in der Membran verankert ist.

Nach Übertragung des Ankers auf das Protein werden die Mannosereste stark mit Poly-N-Acetyllactosaminen modifiziert (Treumann *et al.*, 1997). Auf der Zelloberfläche kommt es dann zur abschließenden Übertragung von Sialinsäuren (Engstler *et al.*, 1993).

Eine Aufgabe von GPI-Ankern ist die Bindung von Proteinen an einer Membran. Die Funktion der Proteine ist durch den GPI-Anker allein auf die ektoplasmatistische Seite beschränkt. Gleichzeitig ermöglicht die GPI-Verankerung die Abspaltung des vollständigen ektoplasmatistischen Proteins von der Membran, ohne dass eine Transmembrandomäne zurückbleibt.

Diese Funktion ist für die Phospholipase C sowohl während der Persistenz im Säugetierwirt (Paulnock und Collier 2001) als auch während der Differenzierung zu prozyklischen Trypanosomen (Bülow *et al.*, 1989) postuliert worden, konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden, da sich die Phospholipase auf der Innenseite der Plasmamembran befindet.

Ein weiteres Beispiel ist die Transglycosylierung der Glucanosyltransferase Gas1, welche bei Untersuchungen in Hefen als Modellprotein für GPI-verankerte Proteine dient (Orlean und Menon 2007). Gas1 gehört zu der Familie der Glucanosyltransferasen mit insgesamt fünf verschiedenen Mitgliedern (Gas1 bis Gas5), wobei Gas2 bis Gas5 bislang nur wenig charakterisiert wurden (Ragni *et al.*, 2007). Gas1 wird zur Plasmamembran transportiert und nach der Abspaltung des Glucosamin-Phosphatidylankers (Kollár *et al.*, 1997) in die Zellwand kovalent eingebaut (Rolli *et al.*, 2009).

Die Rolle der GPI-Verankerung bei der Assoziation von GPI-verankerten Proteinen in *rafts* sowie beide Funktionen bei dem Transport der Proteine zur apikalen Zellmembran in polarisierten Endothelzellen wird nach wie vor kontrovers diskutiert, da normalerweise apikal sortierte Proteine wie die alkalische Phosphatase auch ohne GPI-Anker präferentiell zur apikalen Zellmembran transportiert werden (Brown *et al.*, 1989). Der Anteil der apikal sortierten Proteine sinkt durch Deletion des GPI-Ankers allerdings von 92% auf 70%.

Die Auflösung der *rafts* durch Cholesterol-Depletion führt zum Transport von GPI-verankerten Proteinen zur basolateralen Zellmembran (Paladino *et al.*, 2004). Gleichzeitig mit der Assoziation der Proteine AP und einem GPI-verankerten GFP in *rafts* findet eine Oligomerisierung im Golgi-Apparat statt. Im Fall des GFP-GPIs kann die Oligomerisierung durch Punktmutationen verhindert werden und führt dann zu einer basolateralen Lokalisation (Paladino *et al.*, 2004).



Die Rolle von Glycosylierungen bei der apikalen Sortierung von GPI-verankerten Proteinen ist ebenfalls umstritten. Im Fall des Wachstumshormons führte die N-Glycosylierung einer GPI-verankerten Variante zu einer apikalen Sortierung (Benting *et al.*, 1999), während die Sortierung der AP nicht durch Deletion der Glycosylierungsstellen beeinflusst wurde (Catino *et al.*, 2008).

Eine basolaterale Lokalisation von GPI-verankerten Proteinen wie dem Prionenprotein PrP<sup>C</sup> (Sarnataro *et al.*, 2002) und dem mit einem GPI-Anker versehenen Wachstumshormon ist weder von der Bildung von *rafts* abhängig noch weisen diese Proteine die oben zitierte Oligomerisierung auf (Paladino *et al.*, 2004).

Die genaue Funktion der Organisation von GPI-verankerten Proteinen in *rafts* ist also unklar, obwohl postuliert wurde, dass die Ausbildung von *rafts* die apikale Sortierung erleichtert (Lipardi *et al.*, 2000).

In Säugerzellen ist der Ausschluss von GPI-verankerten Proteinen aus den *coated pits* der clathrinvermittelten Endozytose festgestellt worden (Lemansky *et al.*, 1990). Aufgrund der erhöhten Konzentration von GPI-verankerten Proteinen in Caveolae wurde die Endozytose durch Cavaeolin vermutet (Mayor *et al.*, 1994).

Allerdings weisen Zellen ohne GPI-verankerte Proteine eine erhöhte Expression von Cavaeolin 1 und 2 auf (Abrami *et al.*, 2001). Zudem sind diese Beobachtungen nicht auf *T. brucei* übertragbar, da in Trypanosomen die clathrinvermittelte Endozytose der einzige bekannte Endozytose-Mechanismus ist und somit auch GPI-verankerte Proteine wie VSG clathrinabhängig endozytiert werden (Grünfelder *et al.*, 2002; Grünfelder *et al.*, 2003).

### **2.2.2. GPI-verankerte Oberflächenproteine in Trypanosomen**

In BSF dominiert das GPI-verankerte VSG und macht 10% des Gesamtproteins der Zelle aus. Die Struktur der VSGs ist durch ihre Funktion bei der Abschirmung der Zelle vor dem Immunsystem des Wirtes geprägt. VSG bildet einen dichten Oberflächenmantel von 12-15 nm Dicke aus und verhindert durch die hohe Dichte der Moleküle den Zugang von Antikörpern zu invariablen Komponenten der Zelloberfläche.

VSGs bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne und werden nach der Verteilung von konservierten Cysteinen in beiden Domänen in Klassen (N-terminale Domänen) und Typen (C-terminale Domänen) eingeordnet (Carrington *et al.*, 1991).

Die N-terminalen Domänen umfassen 350-400 Aminosäuren (AS) und bilden in mehreren Schleifen das dem Immunsystem präsentierte Epitop. Die Einteilung in die VSG-Klassen A, B und C erfolgt anhand der Verteilung der konservierten Cysteine in der N-terminalen Domäne, welche intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Einige VSGs wie beispielsweise ILTat 1.22 (Typ A) bilden eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren (Carrington *et al.*, 1991). Die N-terminale Domäne als solche ist relativ resistent gegenüber Proteasen (Johnson und Cross 1979). Die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Domänen weisen

nur eine Identität von 13-30% auf (Blum *et al.*, 1993) und sind nicht sequenzkonserviert (Carrington *et al.*, 1991). Diese Sequenzhomologie ist allerdings wesentlich höher, wenn nur Sequenzen von VSGs derselben Klasse berücksichtigt werden (Blum *et al.*, 1993). Durch Röntgenkristallographie konnte die Struktur der N-terminalen Domäne der Klasse A VSGs MITat 1.2 (VSG221) und ILTat 1.24 aufgeklärt werden, welche sich vor allem durch zwei lange, antiparallele  $\alpha$ -Helices auszeichnet (Metcalf *et al.*, 1987; Freymann *et al.*, 1990). Die Sekundärstrukturen beider Domänen sind zu 60% konserviert (Blum *et al.*, 1993). Es wird deshalb angenommen, dass die Sekundärstrukturen der N-terminalen Domänen innerhalb der einzelnen VSG-Klassen konserviert sind.

Die Einteilung von VSGs in Typen der C-terminalen Domäne beruht zunächst auf der Anzahl und der Verteilung der Cysteinreste, welche innerhalb der Domäne zwei (Typ II, Typ IV, Typ V) oder vier (Typ I, Typ III, Typ VI) Disulfidbrücken ausbilden (Carrington *et al.*, 1991; Berriman *et al.*, 2005). Weitere Faktoren sind bspw. die endständige Aminosäure des GPI-verankerten Proteins, welche Asp (Typ I, Typ IV) oder Ser/Asn (Typ II, Typ III) sein kann. Ebenso spielen Homologien der GPI-Verankerungssignale sowie das Vorhandensein und die Position potentieller Glycosylierungsstellen eine Rolle.

Am meisten ist über die C-terminalen Domänen des Typs I und II bekannt. Die Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne von VSG221 (MITat 1.2) ist durch NMR-Spektroskopie ermittelt worden (Chattopadhyay *et al.*, 2005). Diese Typ II-Domäne beinhaltet insgesamt zwei Disulfidbrücken und eine Glycosylierungsstelle. Die nachfolgende Untersuchung der Typ I C-terminalen Domäne von ILTat 1.24 durch NMR-Spektroskopie zeigte, dass diese Domäne in zwei Subdomänen eingeteilt werden kann, welche beide in ihrer Kernstruktur der bekannten Typ II C-terminalen Domäne ähneln (Jones *et al.*, 2008). Allerdings sind beide dieser Subdomänen leicht verkürzt. Ein bemerkenswerter Unterschied ist auch, dass die zweite, kleinere Subdomäne auch die endständige Aminosäure umfasst und dadurch die Grundlage für ein Modell von Protein mitsamt GPI-Anker bilden kann.

Im prozyklischen Lebensstadium bedecken Prozykline die Zelloberfläche. Wie die VSGs der BSF sind Prozykline mit einem GPI-Anker mit der Zelloberfläche verbunden, bilden allerdings keine Dimere. Zudem unterscheiden sich die GPI-Anker von prozyklischen Trypanosomen in der Modifikation des Inositolringes mit einem Palmitylrest (Field *et al.*, 1991), welcher die Abspaltung des GPI-Ankers durch die Phospholipase C unmöglich macht (Roberts *et al.*, 1988). Das aus dem Blutstromstadium stammende VSG hingegen wird aufgrund des Phospholipase C-sensitiven GPI-Ankers schnell abgespalten (Bülow *et al.*, 1989).

Es ist postuliert worden, dass die charakteristischen Aminosäurewiederholungen der Prozykline EP1, 2 und 3 einen langgestreckten Stamm bilden, welcher lang genug ist, um den ungeordneten N-terminalen Bereich des Proteins oberhalb eines möglichen VSG-Mantels zu halten (Roditi *et al.*, 1989). Die genaue Funktion der Prozykline ist noch nicht geklärt, obwohl vermutet wird, dass die Proteine die Zelloberfläche vor Proteasen schützen



(Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Allerdings können Trypanosomen auch ohne Prozykline Tsetse-Fliegen infizieren und ihren Lebenszyklus vollenden, führen allerdings in weniger Fällen zu einer Infektion der Speicheldrüsen der Tsetse-Fliege (Vassella *et al.*, 2009). Die Ausschaltung der Prozykline führt zu der Bedeckung der Zelloberfläche mit leeren GPI-Ankern, so dass postuliert wurde, dass die GPI-Anker als solche für die Integrität der Zelloberfläche essentiell sind (Mehlert *et al.*, 1998b; Lillico *et al.*, 2003; Vassella *et al.*, 2003).

Auch das Oberflächenprotein des epimastigoten Lebensstadiums BARP (*brucei alanin-rich protein*) ist mit einem GPI-Anker an die Membran gebunden (Urwyler *et al.*, 2007). Einige Isoformen von BARP werden auch im Blutstromstadium exprimiert, in welchem dieses Protein auch ursprünglich entdeckt wurde und in Mikrodomänen auf der Zelloberfläche vorliegt (Nolan *et al.*, 2000). Aufgrund der Tatsache, dass epimastigote Trypanosomen bislang nicht kultivierbar sind, ist über die genaue Funktion von BARP in epimastigoten Trypanosomen nur wenig bekannt.

### **2.2.3. Persistenz im Blutkreislauf von Säugetieren: Antigene Variation**

Die Persistenz von *T. brucei* im Blutstrom des Säugetierwirtes konfrontiert den Erreger direkt mit dem Immunsystem des Wirtes. *T. brucei* stehen zwei Mechanismen zur Verfügung, die es effektiv vor den Antikörpern und dem Komplementsystem des Säugetierwirtes schützen.

Der bekannteste Evasionsmechanismus ist die antigene Variation (Barry und McCulloch 2001; Donelson 2003; Pays 2006). Die Wirksamkeit dieses Mechanismus beruht auf der vollständigen Bedeckung der Zelloberfläche mit dem varianten Oberflächenglycoprotein (VSG), welches als einziges Antigen dem Wirt präsentiert wird.

Obwohl *T. brucei* über ein Repertoire von etwa 1.700 VSGs verfügt (Berriman *et al.*, 2005), wird immer nur eines dieser Gene exprimiert. Eine Vielzahl dieser Gene liegt auf den inaktiven Minichromosomen und kann bei einem sogenannten *switching*-Ereignis durch Rekombination in eine *expression site* gebracht werden. Diese *expression sites* befinden sich nahe den Telomeren an den Enden der Chromosomen und codieren eine variierende Anzahl an *expression site* assoziierten Genen (ESAGs) und als letztes Gen vor den Telomeren das VSG. Die Transkription der *expression site* findet durch die RNA-Polymerase I statt, welche in den meisten anderen Eukaryoten nur rDNA transkribiert. Diese Expression ist möglich, da das capping von mRNAs in Kinetoplastiden nicht an die Transskription durch die DNA-Polymerase II gekoppelt ist und so auch Transkripte der DNA-Polymerase I mit einem 5'-cap versehen werden.

Der VSG-Promotor gehört zu den stärksten in *T. brucei*, wobei immer nur eine der 15 *expression sites* aktiv ist. Die Regulation der Transkription der aktiven *expression site* und

des silencings der anderen *expression sites* ist vermutlich epigenetisch. Hierbei spielen sowohl die Chromatinstruktur (Hughes *et al.*, 2007) als auch die Histonmethylierung eine Rolle (Figueiredo *et al.*, 2008, Figueiredo und Cross 2010).

Der Wechsel des exprimierten VSGs erfolgt stochastisch mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa  $10^{-2}$  pro Generation und Zelle. In wenigen Fällen geschieht dies durch die *in situ*-Aktivierung einer neuen *expression site*, während die Aktivierung durch die Rekombination eines neuen VSG-Gens in die bisherige *expression site* häufiger stattfindet.

Die Häufigkeit dieses *switching*-Ereignisses kann durch die fortwährende Passage der Trypanosomen ohne Durchlaufen des Lebenszyklus auf eine Rate von  $10^{-4}$  bis  $10^{-7}$  gesenkt werden, führt allerdings zu der Ausbildung eines monomorphen Phänotyps (Turner und Barry 1989; Cross 1990). Der Wechsel des exprimierten VSGs erlaubt es der betreffenden Zelle, der Immunantwort des Säugetierwirts gegen das bisherige VSG zu entkommen und so mit einem neuem VSG zu persistieren. Beim betroffenen Säugetierwirt kommt es dadurch zu aufeinanderfolgenden Parasitämien, welche für die afrikanische Schlafkrankheit charakteristisch sind.

Ein zweiter Evasionsmechanismus besteht darin, dass *T. brucei* durch Sekretion eines parakrinen Faktors die Produktion von Interferon  $\gamma$  durch die CD8(+) T-Zellen stimuliert (Bakhiet *et al.*, 1993, Antoine-Moussiaux *et al.*, 2009). Die alternative Aktivierung von Makrophagen ist wiederum oft mit einem Anstieg der Argininase-Aktivität verbunden, welche wiederum das Wachstum der Parasiten unterstützt und die Produktion von Stickstoffoxid hemmt (Duleu *et al.*, 2004). Allerdings unterscheiden sich unterschiedliche Stämme von *T. brucei gambiense* zum Teil bezüglich dieser Immunomodulation trotz hoher genetischer Übereinstimmung (Holzmüller *et al.*, 2008).

Einen weiteren Evasionsmechanismus stellt das aktive Schwimmverhalten der Trypanosomen dar, das die Ansammlung von antikörpergebundenen VSGs an der posterioren Zellhälfte und somit nahe der Flagellartasche bewirkt (Engstler *et al.*, 2007b). Die nachfolgende Endozytose der komplexierten VSGs verhindert eine Aktivierung des Komplementsystems durch die exponierten Antikörper.

## **2.3. Besonderheiten von *T. brucei***

### **2.3.1. Der Zellzyklus von *T. brucei***

*Trypanosoma brucei* zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus, die in anderen eukaryotischen Zellen in der Form nicht ausgeprägt sind.

Der einzellige Organismus proliferiert durch longitudinale Zweiteilung in drei Lebensstadien (*long slender* Blutstromstadium, Prozyklisches Stadium, Epimastigotes Stadium). Am ausführlichsten ist hierbei die Teilung der prozyklischen Zellen untersucht worden, während über die Teilung der epimastigoten Teilung nur wenig bekannt ist (McKean 2003; Vaughan und Gull 2008).

Da *T. brucei* von den meisten Organellen nur ein Exemplar besitzt, ist die Regulation der Zellteilung eng mit der Duplikation und Segregation von Organellen verbunden. Die Duplikation beinhaltet sowohl Komponenten der bisherigen Organellen als auch *de novo* synthetisiertes Material (He *et al.*, 2004).

Bei der Einteilung des Zellzyklus spielt der Kinetoplast eine entscheidende Rolle, da seine Replikation und die anschließende Segregation einen eigenen Zyklus aufweisen, welcher im Vergleich zu dem Zyklus des Nukleus verschoben ist.

Bemerkenswert ist, dass bislang keine *check points* der Mitose in *T. brucei* nachgewiesen werden konnten. Bei unvollständiger Zytokinese entstehen häufig multinukleäre Zellaggregate mit einer verschiedenen Anzahl an Kinetoplasten und Zellkernen (Ploubidou *et al.*, 1999).

Der Ablauf der Zytokinese kann anhand des Aufbaus des Tochterflagellums gut dokumentiert werden. Sowohl die Bildung des neuen Flagellums als auch die Verbindung an der *flagellar attachment zone* (FAZ) sind essentiell für den vollständigen Ablauf des Zellzyklus. Die Störung beider Abläufe führt zur ungleichmäßigen Teilung (Kohl *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass die FAZ nicht nur das Flagellum mit der Zellmembran verbindet, sondern auch die Zytokinese koordiniert (Gull 1999). Bei der Bildung der neuen FAZ spielt der sogenannte *flagellar pocket collar* eine essentielle Rolle (Bonhivers *et al.*, 2008).

Voraussetzung für die Bildung des Tochterflagellums ist zunächst die Verdoppelung der beiden Basalkörper. Der neue Basalkörper markiert durch seine Position neben dem alten Basalkörper den Punkt, an dem das neue Flagellum gebildet wird. Während das neue Flagellum verlängert wird, wird der Golgi-Apparat dupliziert und die DNA des Kinetoplasten und des Nukleus repliziert. Anschließend segregieren zunächst die Kinetoplasten und erst danach die Zellkerne. In prozyklischen Zellen kommt es zur Positionierung eines Zellkerns zwischen den beiden Flagellen. Anschließend werden die Zellen longitudinal durch Ausbildung einer Teilungsfurche geteilt. Die Teilungsfurche von BSF ist wesentlich seltener zu beobachten, da die Zytokinese in diesem Lebensstadium vermutlich schneller abläuft als in prozyklischen Zellen. Actin ist nicht an der Ausbildung dieser Furche beteiligt (García-Salcedo *et al.*, 2004).

Die Teilung der epimastigoten Trypanosomen ist bislang nur wenig erforscht worden, da dieses Lebensstadium nicht *in vitro* kultiviert werden kann (Brun und Jenni 1985). Epimastigote Trypanosomen unterlaufen im Proventrikulus eine asymmetrische Teilung, während sie an den Mikrovilli haften. Es wird angenommen, dass nur die kleinere der beiden Tochterzellen weiter zu metazyklischen Trypanosomen differenziert und in die Speicheldrüsen wandert (Vaughan und Gull 2008). Diese kurzen epimastigoten Trypanosomen können eine Meiose durchlaufen und sich so kreuzen (Gibson *et al.*, 2008).

### 2.3.2. Besonderheiten des Genoms von *T. brucei*

Das Genom von *T. brucei* besteht im Nukleus aus Chromosomen dreier unterschiedlicher Größen. Die meisten Gene liegen auf den 11 Megabasenchromosomen, welche sequenziert worden sind (Berriman *et al.*, 2005). Im Unterschied dazu beinhalten die wenigen intermediären und etwa 100 kleinen Chromosomen mit 200–900 bzw. 50–150 kb Größe vor allem Sequenzen, welche den subtelomerischen Regionen der Megabasenchromosomen ähneln (Wickstead *et al.*, 2004). Diese Minichromosomen beinhalten die meisten der ca. 1700 VSG-Gene und -Pseudogene, auf denen die antigene Variation beruht.

In *T. brucei* findet Genregulation vor allem posttranskriptionell statt (Clayton und Shapira 2007). Mit Ausnahme der *VSG-expression site*, dem Prozyklin-Gen-Cluster und den rRNAs werden alle Gene durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II transkribiert. Der Promotor sowie die Transkriptionsinitiation unterscheiden sich vermutlich stark von denen anderer eukaryotischer Zellen, so dass der Polymerase II-Promotor bislang nicht vollständig charakterisiert worden ist und bislang nur drei Transkriptionsfaktoren bekannt sind (Schimanski *et al.*, 2005; Palenchar *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Im Zuge der Reifung der polycistronischen Prä-mRNA erfolgt das *trans*-Spleißen jeder mRNA. Dieser Prozess ist zuerst in Trypanosomen entdeckt worden (Boothroyd und Cross 1982) und konnte auch in Nematoden wie *C. elegans* nachgewiesen werden (Hastings 2005). Im Unterschied zu dem *spliced leader trans*-Spleißen gibt es in den Chloroplasten und Mitochondrien von Algen und Pflanzen ein *trans*-Spleißen, das auf einem diskontinuierlichen Intron der Gruppe II beruht (Wissinger *et al.*, 1992). Mittlerweile ist *trans*-Spleißen allerdings auch in humanen Zellen beobachtet worden (Li *et al.*, 2008).

In *T. brucei* wird durch *trans*-Spleißen das sogenannte Mini-Exon oder *spliced leader transcript* aus einer zweiten RNA an das 5'-Ende der mRNA angehängt (Laird 1989; Ullu *et al.*, 1993). Dieses Mini-Exon ist für alle mRNAs in *T. brucei* einheitlich.

Die eigentliche Genregulation erfolgt über die Stabilität der individuellen mRNAs (Haanstra *et al.*, 2008), obwohl es auch Hinweise auf eine lebensstadienabhängige Regulation durch die Effizienz des *trans*-Spleißens gibt (Siegel *et al.*, 2005; Helm *et al.*, 2008).

Nur ungefähr 2% der Gene von *T. brucei* werden im Blutstromstadium und im prozyklischen Stadium unterschiedlich stark exprimiert (Brems *et al.*, 2005). Die prominentesten Gen-Cluster sind hierbei die durch die  $\alpha$ -Amanitin-resistenten DNA-Polymerase I transkribierte *VSG-expression site* des Blutstromstadiums und das Prozyklin-Cluster des prozyklischen Stadiums (Günzl *et al.*, 2003). Die Stärke der Genexpression wird allerdings auch bei den Oberflächenproteinen stark durch die 3'-UTR und somit die mRNA-Stabilität beeinflusst (Engstler und Boshart 2004).

### 2.3.3. Das Mitochondrium

Trypanosomen verfügen über ein einzelnes Mitochondrium, welches je nach Lebensstadium unterschiedlich aktiv ist und verschiedene Aufgaben hat (Timms *et al.*, 2002). Im Blutstromstadium ist das Mitochondrium kaum aktiv und verfügt nur über eine rudimentäre Atmungskette mit der terminalen alternativen Oxidase (TAO). Diese Atmungskette dient allerdings lediglich der Oxidation von Reduktionsäquivalenten und spielt keine Rolle bei der ATP-Gewinnung (Opperdoes *et al.*, 1977; van Hellemond *et al.*, 2005).

Die Mitochondrien von *T. brucei* enthalten den sogenannten Kinetoplasten, welcher der Ordnung den Namen gibt. Der Kinetoplast besitzt die stark verwobene mitochondriale zirkuläre DNA, welche aus tausenden kleiner DNA-Ringe (0,5–1kb) und 40–50 großen DNA-Ringen besteht. Diese kDNA ist die komplexeste bekannte mitochondriale DNA und macht 10-20% der gesamten DNA der Kinetoplasten aus (Liu *et al.*, 2005).

Die großen DNA-Ringe codieren ribosomale RNA-Untereinheiten und Komponenten der Atmungskette. Nach Transkription wird die mRNA durch RNA-Editing modifiziert und bilden so unterschiedliche reife mRNAs. Dieser Prozess besteht vor allem aus der Einfügung oder Entfernung von Uridylaten und wird durch kleine *guide* RNAs vermittelt (Liu *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2005). Diese gRNAs werden durch die kleinen DNA-Ringe codiert.

Es ist möglich, BSF ohne Kinetoplasten zu erzeugen, welche allerdings nach der Transformation zu prozyklischen Trypanosomen absterben (Timms *et al.*, 2002).

Die großen DNA-Ringe sind in *T. equiperdum* und *T. evansi* nicht mehr nachweisbar (Lai *et al.*, 2008), weshalb diese Arten nur monomorph im Blutstromstadium vorkommen.

Der Basalkörper ist eng mit dem Kinetoplasten verbunden (Ogbadoyi *et al.*, 2003) und entspricht den Zentriolen in anderen Säugerzellen (Dawe *et al.*, 2007). Bei der Zellteilung wird das neue Flagellum auf Grundlage des zweiten Basalkörpers gebildet (Sherwin und Gull 1989).

Das Flagellum ist klassisch aus 9+2 Mikrotubuli aufgebaut und beinhaltet außerdem noch den *paraflagellar rod*, welcher für die Bewegung essentiell ist (Bastin *et al.*, 1998).

### 2.3.4. Glycosomen: kompartimentierte Glycolyse

Eine weitere Besonderheit bei *Trypanosomatidae* sind die Glycosomen. Diese Organellen spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus von *T. brucei* und entsprechen trotz fehlender Katalase den Peroxisomen in anderen Organismen (Hannaert *et al.*, 2003; Moyersoen *et al.*, 2003). BSF besitzen nur einen unvollständigen Krebs-Zyklus und eine rudimentäre Atmungskette, so dass der Bedarf an ATP ausschließlich durch die Glycolyse von Kohlenhydraten zu Pyruvat gedeckt wird. Die Kompartimentierung der ersten sieben Schritte der Glycolyse ermöglicht die Regulation der Enzyme allein durch das Verhältnis der Konzentrationen von ATP und ADP, da die regulierten Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase von dem bei der letzten Reaktion der Glycolyse entstehenden ATP

getrennt sind (Michels *et al.*, 2006, Haanstra *et al.*, 2008). Diese Regulation ermöglicht eine sehr viel schnellere Regulation des ATP-Spiegels auch während anaerober Phasen (Helfert *et al.*, 2001) und ist auch in prozyklischen Trypanosomen bei Anwesenheit von Glucose essentiell (Furuya *et al.*, 2002). In prozyklischen Trypanosomen dient die Glycolyse vor allem als Kohlenstoffquelle, welche durch den Abbau von L-Prolin ergänzt wird (Coustou *et al.*, 2003).

Glycosomen der prozyklischen Trypanosomen beinhalten außerdem die Enzyme des oxidativen Pentose-Phosphatweges, der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, der Purin- und der Pyrimidinbiosynthese (Michels *et al.*, 2006). Allerdings sind diese Enzyme im Blutstromstadium stark reprimiert, so dass BSF auf externes Pyrimidin und Hypoxanthin angewiesen sind.

### **2.3.5. Das Zytoskelett von *T. brucei***

Ungewöhnlich ist die Rolle der Mikrotubuli in *T. brucei*. Die Plasmamembran wird durch ein Korsett von subpellikularen Mikrotubuli gestützt. Diese Mikrotubuli sind stark vernetzt (Sant'Anna *et al.*, 2005) und auf das posteriore Ende der Zelle ausgerichtet. Eine Ausnahme bilden allein vier Mikrotubuli, welche entlang der *flagellar attachment zone* (FAZ) verlaufen und welche bei dem Transport von VSGs auf der Zelloberfläche entlang des Flagellums eine Rolle spielen (Engstler, persönliche Mitteilung). Eine Filamentstruktur verbindet den *flagellar rod* mit der FAZ und den vier Mikrotubuli (Vaughan und Gull 2008). Die FAZ bestimmt außerdem vermutlich die Position der Teilungsfurche bei der Zytokinese (Robinson *et al.*, 1995) und den Ort der Exozytose.

Ausgespart von diesem Korsett ist allein die Flagellartasche (Webster und Russell 1993; Overath *et al.*, 1997; Gull 2003). Der Austrittspunkt des Flagellums aus der Flagellartasche weist eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit Hemidesmosomen auf. Dieser Ring wird unter anderem von dem Protein BILBO1 gebildet, welches an der Teilung der Flagellartasche beteiligt ist (Bonhivers *et al.*, 2008). In der Membran der Flagellartasche liegen verschiedene Rezeptoren in höherer Konzentration vor. Das Lumen der Flagellartasche ist mit N-glycosylierten Proteoglycanen angefüllt (Overath *et al.*, 1997; Atrih *et al.*, 2005).

Die Flagellartasche ist der exklusive Ort der Endo- und Exozytose (Allen *et al.*, 2003; Grünfelder *et al.*, 2003; Engstler *et al.*, 2004). VSG wird durch clathrinbedeckte Vesikel der Klasse I (CCV I) internalisiert. Dabei weist *T. brucei* eine enorm hohe Endozytoserate mit sechs Vesikeln pro Sekunde auf (Engstler *et al.*, 2004). Das Fehlen einiger Komponenten der Clathrin-Maschinerie wie bspw. das Adaptorprotein 2 lässt die Frage nach dem genauen Mechanismus der clathrinvermittelten Endozytose in *T. brucei* offen.

### **2.3.6. Der sekretorische und endozytische Apparat**

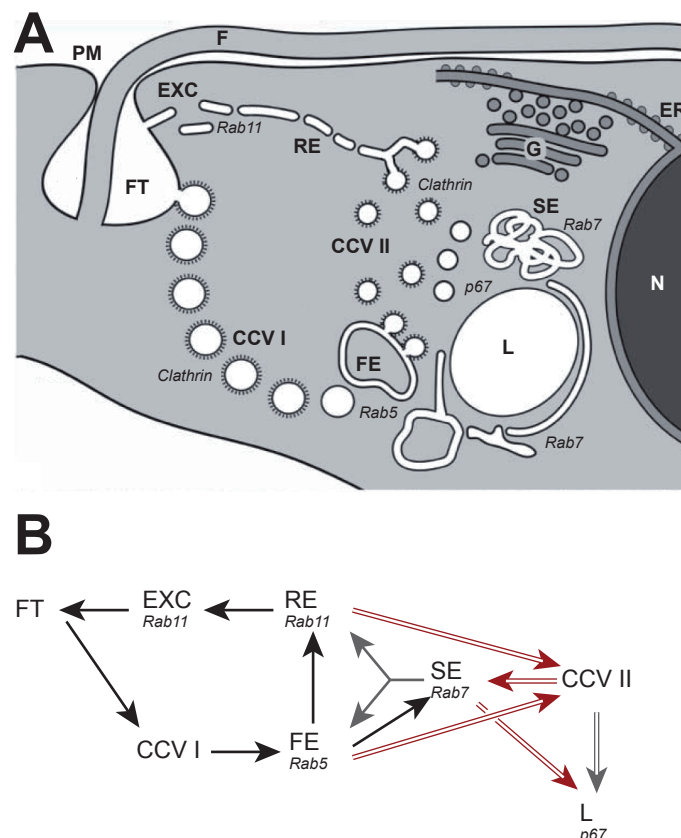
Der Proteintransport in *T. brucei* ist maßgeblich dadurch geprägt, dass viele Organellen nur einmal in jeder Zelle vorhanden sind. Eine der wichtigsten Funktionen des



Endomembransystems ist der Transport von GPI-verankerten Oberflächenproteinen zur Flagellartasche, dem einzigen Ort von Exo- und Endozytose (Overath *et al.*, 1997; Gull 2003). Die Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht über den sekretorischen und endozytischen Apparat von *T. brucei* sowie die bekannten Transportrouten von GPI-verankerten VSGs und lumenaler Fracht.

Mit Ausnahme von Teilen des ERs und den Glycosomen ist das gesamte Endomembransystem auf den posterioren Teil der Zelle konzentriert. Das ER erstreckt sich entlang der *flagellar attachment zone* (FAZ) über die gesamte Zellachse von anteriorem Ende zur Flagellartasche hinweg.

Das ER ist als Ort der Proteinsynthese, GPI-Verankerung und Faltungskontrolle für das Trafficking von GPI-verankerten Proteinen entscheidend. Die ER-Retention wird durch das C-terminale Tetrapeptid MDDL gewährleistet. Transmembranprotein wie die Ca<sup>2+</sup>-ATPase können hingegen aufgrund des C-terminalen Dileucin-Retentionssignals KKXX



**Abb. 3: Übersicht über die sekretorischen und endozytischen Kompartimente in *T. brucei*:** A) Schematische Darstellung mit den ungefähren Positionen der jeweiligen Organellen; B) Skizzierung der Transportwege von VSG (solide Pfeile) und lumenaler Fracht (Doppelpfeile) in *T. brucei* (nach Engstler *et al.*, 2004; Abbildung modifiziert aus ebd.). Graue Pfeile markieren vermutete Transportwege. Die Markerproteine zur Identifizierung der einzelnen Kompartimente sind mit angegeben. CCV: clathrinbedeckte Vesikel; ER: endoplasmatisches Retikulum; EXC: exozytische Carrier; F: Flagellum; FE: frühe Endosomen; FT: Flagellartasche; G: Golgi-Apparat; L: Lysosom; N: Nukleus; PM: Plasmamembran; RE: recycling Endosomen; SE: späte Endosomen.

ins ER zurücktransportiert werden (Furuya *et al.*, 2001). Allerdings ist die Funktionalität dieses Retentionsmechanismus umstritten (Engstler *et al.*, 2007a).

Neusynthetisierte Proteine unterliegen einer strikten Qualitätskontrolle. Hierbei können zwei grundlegende Kontrollmechanismen unterschieden werden. Das Chaperon BiP der HSP70-Familie, welches in *T. brucei* gut charakterisiert worden ist (Bangs *et al.*, 1993; Bangs *et al.*, 1996), interagiert mit hydrophoben Bereichen der naszierenden Proteinketten während der Translokation. Anschließend werden die Proteine durch Endoplasmin gefaltet und durch die Proteindisulfidisomerase Disulfidbrücken generiert. Die beiden bislang in *T. brucei* charakterisierten Proteindisulfidisomerasen weisen allerdings eine lysosomale oder endosomale Lokalisation trotz Retentionssignal auf (Rubotham *et al.*, 2005).

Alternativ wird in Trypanosomen nach Addition von Oligosachariden an Asparagin die Faltung der Proteine durch wiederholte Zyklen der Glucosylierung und Deglycosylierung überprüft. Im Unterschied zu dem Mechanismus in Säugerzellen wird das Oligosaccharid in *T. cruzi* erst nach Transfer auf das naszierende Protein glycosyliert (Parodi *et al.*, 1983; Parodi 1998). Die Proteine werden lediglich monoglycosyliert, und die ER-Glucosidase I ist in Trypanosomen nicht nachweisbar. Die Glucosidase II konnte allerdings in *T. brucei* nachgewiesen werden.

Während in Säugerzellen die glycosylierten Proteine durch die beiden Lektine Calnexin und Calreticulin im Rahmen der Faltungskontrolle gebunden werden, sind im Genom von *T. brucei* nur Homologe von Calreticulin gefunden worden (Berriman *et al.*, 2005). Beide Enzyme sind allerdings vermutlich Isozyme, da Calreticulin in *T. cruzi* nicht essentiell ist (Conte *et al.*, 2003).

Eine besondere Domäne des ERs ist die *exit site* des ER (ERES) im ER, welches in *Leishmania mexicana* untersucht wurde (Weise *et al.*, 2000). Durch Elektronenmikroskopie wurde eine Vielzahl von Vesikeln in dem ca. 100 nm breiten Spalt zwischen ER und Golgi-Apparat nachgewiesen. Die Abwesenheit von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten würde einen Vesikeltransport basierend auf Diffusion bedingen. In *T. brucei* beträgt der Abstand zwischen ER und Golgi-Apparat ebenfalls 50-140 nm (O. Karo, Diplomarbeit). Der eigentliche Spalt zwischen ER und Golgi-Apparat beinhaltet allerdings fast ausschließlich naszierende oder fusionierende Vesikel. Die ERES spielt auch eine Rolle bei der Duplikation des Golgi-Apparates und wird gleichzeitig mit dem neuen Golgi-Apparat gebildet (He *et al.*, 2004).

Der Golgi-Apparat der BSF besteht aus 5-8 Zisternen. Die Positionierung des Golgi-Apparates ist, ähnlich der des Lysosoms, spezifisch und nahe dem Nukleus (Field und Carrington 2004; Overath und Engstler 2004). Allerdings dispergiert der Golgi-Apparat in *T. brucei* im Gegensatz zu dem Golgi-Apparat in Säugerzellen nicht während des Zellzyklus, sondern repliziert sich zumindest partiell durch Teilung (Field *et al.*, 2000; He *et al.*, 2004).



Nach Endozytose gelangen sowohl lumenale Fracht wie internalisierte Membran durch clathrinbedeckte Vesikel der Klasse I (CCV I) ins endozytische Kompartiment. BSF weisen die höchste bekannte Endozytoserate auf, während prozyklische Trypanosomen eine wesentlich langsamer endozytieren (Natesan *et al.*, 2007). Dies korreliert mit jeweiligen Expressionsniveaus von Clathrin. Im Vergleich zu der Clathrin-vermittelten Endozytose in Säuger- und Hefezellen lassen sich einige Unterschiede feststellen: Das Fehlen des Adaptorproteins AP-2 im Genom und die fehlende Konzentrierung von Clathrin und Rezeptoren bei der Bildung von *coated pits* weisen auf einen alternativen Mechanismus bei der Bindung von Clathrin an die Membran hin (Morgan *et al.*, 2002; Grünfelder *et al.*, 2003; Engstler *et al.*, 2004).

Durch CCV I wird das endozytierte Material in das endosomale Kompartiment transportiert. In *T. brucei* kann man zwischen frühen, späten und *recycling* Endosomen unterscheiden. Grundlage für die Charakterisierung sind hierbei spezifische Markerproteine, die Morphologie der Endosomen sowie ihre Position in der Zelle. Als Markerprotein für die frühen Endosomen dienen zumeist die beiden Isoformen von *TbRab5* (Pal *et al.*, 2002b), dessen beiden Isoformen in BSF frühe Endosomen mit verschiedenen Proteinen dekorieren. Während *TbRab5a*-positive frühe Endosomen sowohl VSG als auch Transferrin und ISG65 beinhalten, ist in *TbRab5b*-positiven Endosomen nur ISG100 nachweisbar. Die zugrundeliegende Sortierung ist bislang allerdings völlig ungeklärt. Frühe Endosomen sind große, runde Zisternen, welche nahe dem Nukleus lokalisieren (Grünfelder *et al.*, 2003; Engstler *et al.*, 2004). Eine temporäre Kontinuität zwischen den frühen Endosomen und den *recycling* Endosomen wurde für Säugerzellen vermutet (Sönnichsen *et al.*, 2000) und konnten in elektronentomographischen Aufnahmen von *T. brucei* nachgewiesen werden (O. Karo, Diplomarbeit). Allerdings konnte bislang nicht beantwortet werden, ob diese Verbindungen der Membransystem transient oder statisch sind. Auch die Auswirkung einer solchen Verbindung auf die erste Trennung zwischen der lumenalen Cargo und der membrangebundenen Cargo, welche in frühen Endosomen stattfindet (M. Engstler, unveröffentlicht), ist noch unklar.

In Säugerzellen finden in den frühen Endosomen Sortierungsprozesse statt, bei denen Membranproteine über tubuläre Vesikel zu den *recycling* Endosomen transportiert werden. In *T. brucei* konnte bislang allerdings keine Bildung von tubulären Vesikeln aus frühen Endosomen beobachtet werden (Engstler *et al.*, 2007), obwohl auch hier ein Ausschluss der membrangebundenen Proteine von den clathrinbedeckten Vesikeln Klasse II (*clathrin coated vesicles* II, CCV II) stattfindet. Über diese Vesikel wird die lumenale Fracht zu den späten Endosomen transportiert (Engstler *et al.*, 2004). Die beiden weiteren Transportmöglichkeiten zu *recycling* Endosomen und direkt zu den späten Endosomen gelten sowohl für membrangebundene Proteine wie für lumenale Fracht.

Der Transport zu späten Endosomen ist in Säugerzellen ausgesprochen strikt reguliert (Bonifacino und Traub 2003). In diesem System ist nach wie vor ungeklärt, ob es sich bei frühen und späten Endosomen um stabile Kompartimente handelt oder ob eine Reifung der ersteren zu letzteren stattfindet. In *T. brucei* hingegen wird von einem stabilen Kompartiment ausgegangen (Engstler *et al.*, 2007a). Ungeklärt ist allerdings nach wie vor, wie das endozytierte Material aus den frühen Endosomen in die späten Endosomen gelangt, da bislang nur CCV als Transportvesikel nachgewiesen wurden. Diese Vesikel beinhalten allerdings nur die lumenale Fracht und schließen GPI-verankerte Proteine wie VSG aus. Gleichzeitig ist ein Transport von biotinylierten VSG von frühen Endosomen in späte Endosomen nachgewiesen worden (Engstler *et al.*, 2004). Ähnlich wie in Säugerzellen (Gruenberg und Stenmark 2004) sind auch in *T. brucei* MVBs zu beobachten. Abhängig von der Dekorierung mit Rab5 oder Rab7 sowie ihrer Position können diese dem frühen oder späten endosomalen Kompartiment zugeordnet werden (Allen *et al.*, 2007). Die Rolle der *multivesicular bodies* (MVB) in diesem Bereich ist nach wie vor ungeklärt, allerdings konnten die Komponenten und Signale für die Ubiquitylierung und die Funktion des ESCRT-Komplexes identifiziert werden (Leung *et al.*, 2008).

Morphologisch sind die späten Endosomen durch ihre unregelmäßige Form klar von den frühen Endosomen abgrenzbar, obwohl beide in *T. brucei* nahe dem Lysosom und dem Nukleus liegen. Auch die jeweiligen MVBs können aufgrund der zirkulären Gestalt der frühendosomalen MVBs voneinander unterschieden werden (M. Engstler, pers. Mitteilung).

Das einzelne Lysosom weist in BSF eine hohe proteolytische Aktivität auf (Mackey *et al.*, 2004). Bisher konnten die beiden lysosomalen Cystein-Proteasen Cathepsin-L und Cathepsin-B identifiziert werden (Mottram *et al.*, 1989; Pamer *et al.*, 1989). Der trypanolytische Faktor wirkt in *T. brucei brucei* vermutlich durch Porenbildung in der lysosomalen Membran und somit Eflux von Chlorid in das Zytoplasma (Pays *et al.*, 2006).

Die Sortierungssignale, welche zum Transport dieser lumenalen Proteine zum Lysosom führen, unterscheiden sich in *T. brucei* stark von den bekannten Mechanismen in Säugerzellen. In *T. cruzi* und vermutlich allen Kinetoplastiden gibt es keine Mannose-6-phosphat-Modifikation (Cazzulo *et al.*, 1990). Ebenso konnten bisher auch keine homologen Gene zu den dazugehörigen Transmembranrezeptoren gefunden werden. Der Transport von lumenalen Proteinen zum Lysosom wird in *T. brucei* durch membranassoziierte Sortierungssignale der Präproteine reguliert (Huete-Pérez *et al.*, 1999). In diesem Kontext ist allerdings die gegenseitige Beeinflussung von Proteinfaltung und Sortierungssignal entscheidend.

Das lysosomale Transmembranprotein p67 wird aufgrund eines zytoplasmatischen Dileucinmotivs in prozyklischen Trypanosomen zum Lysosom transportiert (Alexander *et al.*, 2002; Tazeh und Bangs 2007). Diese Transportregulation ist allerdings lebensstadienabhängig, da die Deletion des Motivs in BSF keinen Effekt auf die lysosomale Lokalisation nach sich zieht. Zudem spielt das Adaptorprotein AP-1 keine Rolle bei dem Transport von p67 (Allen *et al.*, 2007). Der *knock down* von p67 führt in *T. brucei brucei* nicht nur zum Anschwellen des Lysosoms, sondern auch zu einer Resistenz gegenüber dem TLF (Peck *et al.*, 2008).

Ungleich komplexer sind die Vorgänge in den *recycling* Endosomen. Während die *recycling* Endosomen in Säugerzellen eine tubuläre Struktur aufweisen, verfügt *T. brucei* über ein einzelnes großes, fenestriertes Endosom (O. Karo, Diplomarbeit; M. Engstler, pers. Mitteilung). *TbRab11* ist spezifisch für dieses Kompartiment.

Membrangebundene Proteine und lumenale Fracht werden sowohl von den frühen Endosomen als auch von den späten Endosomen aus zu den *recycling* Endosomen transportiert (Engstler *et al.*, 2004). In dem Kompartiment werden gebundene Liganden von den Rezeptoren gelöst und zusammen mit der lumenalen Fracht in CCV II abgetrennt (M. Engstler, pers. Mitteilung). Dieser Sortierungsmechanismus beruht vermutlich auf dem Ausschluss der GPI-verankerten Proteine von den Vesikeln und führt so passiv zu der Aufkonzentrierung von VSG in den *recycling* Endosomen (Grünfelder *et al.*, 2003). Von den *recycling* Endosomen spalten sich die sogenannten exozytischen Carrier ab, welche die membrangebundenen Proteine zur Flagellartasche transportieren und dort in einer konkreten Region nahe der FAZ mit der Plasmamembran verschmelzen (Grünfelder *et al.*, 2003) (M. Engstler, pers. Mitteilung). Aufgrund der scheibenförmigen Gestalt dieser Carrier findet diese Fusion mit der Plasmamembran unter einer starken Biegung der Membran statt. Es wird vermutet, dass sich an diesem Punkt ein Teil der GPI-verankerten Proteine aus der Membran löst und trotz GPI-Verankerung ins Lumen der Flagellartasche wechselt (M. Engstler, pers. Mitteilung). Sowohl die *recycling* Endosomen als auch die exozytischen Carrier sind mit Rab11 dekoriert, weshalb dieses Protein als Markerprotein für diese Endosomen gilt (Jeffries *et al.*, 2001).

Während in Säugerzellen die Exozytose sowohl über *recycling* Endosomen als auch unabhängig von ihnen stattfinden kann (Mayor *et al.*, 1993; Hao und Maxfield 2000), konnten in *T. brucei* bislang nur die Rab11-positiven exozytischen Carrier, welche aus den *recycling* Endosomen stammen, nachgewiesen werden (M. Engstler, pers. Mitteilung). In Anbetracht der Konzentrierung von Exo- und Endozytose auf die Membran der Flagellartasche ist dies ein starker Hinweis auf die exklusive Exozytose durch Rab11-positive exozytische Carrier.

Insgesamt zeigt das Endomembransystem verglichen mit Säugerzellen einige Besonderheiten. Immerhin 16 Rab-ähnliche Proteine wurden durch phylogenetische Untersuchungen gefunden (Ackers *et al.*, 2005). Im Vergleich hierzu weisen Menschen 60 unterschiedliche Rab-Proteine auf, welche allerdings zum Teil gewebsspezifisch sind. Die Spaltheife hingegen besitzt nur 7 unterschiedliche Rab-Proteine. Allerdings konnten nur 11 *TbRabs* anhand ihrer Ähnlichkeit klassifiziert werden, die Bezifferung der restlichen 5 ist aufgrund nur geringer Homologien unsicher und daher ungeklärt.

## 2.4. Aufgabenstellung

Die Nutzung von *T. brucei* als Modellsystem weist einige entscheidende Vorteile auf. Sowohl das Fehlen einer gewissen Anzahl redundanter Transportwege wie bspw. der Mannose-6-phosphatweg als auch das Vorliegen von nur einem Golgi-Apparat, einem Lysosom und einem *recycling* Endosom ermöglicht die detailliertere Betrachtung dieses reduzierten und zellarchitektonisch geordneten Transportsystems. Gleichzeitig stimmen die Transportwege und Mechanismen zwischen Säugersystem und *T. brucei* in Eckpunkten überein, wodurch eine Ableitung der Ergebnisse in *T. brucei* auf das Säugersystem möglich wird.

Gleichzeitig ermöglicht *T. brucei* als kultivierbarer Einzeller einen stark vereinfachten experimentellen Zugang durch eine Vielzahl von Techniken. Besonders RNAi sei hier erwähnt, da bspw. in Säugerzellen ähnliche Effekte nur durch Einbringen von siRNA erlauben. Die Herstellung stabiler RNAi-Zelllinien von *T. brucei* erlaubt hier die Arbeit mit klonalen Transfektanten.

Die lebensstadienspezifischen Änderungen des Endomembransystems eröffnen zusätzlich Möglichkeiten, unterschiedliche Regulationsmechanismen in ein und demselben Organismus näher zu beschreiben. Ein gutes Beispiel sind die beiden Isoformen von *TbRab5*, welche in BSF unterschiedliche frühe Endosomen dekorieren, in prozyklischen Trypanosomen allerdings keine unterschiedliche Lokalisation aufweisen (Field *et al.*, 1998; Pal *et al.*, 2002b).

Beide Lebensstadien weisen sehr unterschiedliche Endozytoseraten auf. Während die Funktion eines dichten Proteinmantels in BSF essentiell für die Funktionalität der atigenen Variation ist, ist die Funktion der Prozyklone und somit die Anforderungen an das Trafficking der Oberflächenproteine in diesem Lebensstadium noch nicht geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Untersuchung der Transportprozesse in den unterschiedlichen Lebensstadien von *T. brucei* zu ermöglichen und zu etablieren. Die Herstellung einer pleomorphen induzierbaren Zelllinie ermöglicht die nähere Untersuchung der beiden BSF-Lebensstadien und des prozyklischen Lebensstadiums mit derselben Zelllinie und somit identischem Genotyp. Dadurch werden vergleichende Arbeiten zum Trafficking in *T. brucei*

möglich und somit die Erklärung der lebensstadienspezifischen Änderungen in *T. brucei* möglich.

Um dieses Ziel zu erreichen, muss zunächst ein grundlegendes Assay entwickelt werden, welches nach eingehender Charakterisierung in *Is* BSF auch in PCF und *ss* BSF durchgeführt werden soll und die Identifikation und Funktion von Regulatoren des Endomembransystems in *T. brucei* ermöglicht.

Als erster Schritt sollte in dieser Arbeit die Grundlage dazu gelegt werden und ein entsprechendes Assay in *Is* BSF bei gleichzeitiger Herstellung einer pleomorphen Zelllinie durchgeführt werden. Hierbei wurde zunächst ein Schwerpunkt auf die Herstellung und Etablierung verschiedener Markerproteine gelegt und anschließend die Funktion einer Auswahl von Komponenten des Proteintraffickings durch RNAi näher bestimmt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

In Tabelle 2 sind die verwendeten Chemikalien mit Angabe des Herstellers aufgelistet, in Tabelle 3 die verwendeten Kits. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die genutzten Antikörper mit den dazugehörigen Verdünnungen sowie der jeweiligen Herkunft. An dieser Stelle möchte ich den betreffenden Kooperationspartnern herzlich für Bereitstellung von primären Antikörpern danken.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien**

Chemikalie	Firma	Verwendungszweck
4',6-di-Amidino-2-phenylindol (DAPI)	Applichem	Fluoreszenzmikroskopie
6-Amino-hexansäure	Roth	SDS-PAGE / Western Blot
Agar	Applichem	Bakterienkultivierung
Agarose, NEEO Ultra-Qualität	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Amberlite, MB-150	Sigma-Aldrich	RNA-AGE / Northern Blot
Ammoniumperoxodisulfat, <i>p.a.</i>	Roth	SDS-PAGE / Western Blot
Ampicillin Natriumsalz	Roth	Bakterienkultivierung
Bathocuproin	Serva	Trypanosomenkultivierung
Biozym LE Agarose	Biozym	DNA / Klonierungen
Blue™ <i>pre-stained standard</i>	Invitrogen	SDS-PAGE / Western Blot
Bromphenolblau	Merck	Gelelektrophorese
BSA Fraktion V	GE Healthcare	Fluoreszenzmikroskopie
D-Biotin	Sigma-Aldrich	Fluoreszenzmikroskopie
D(+) Glukose	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
di-Kaliumhydrogenphosphat, <i>p.a.</i>	Roth	
di-Natriumhydrogenphosphat, <i>p.a.</i>	Roth	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Dithiothreitol (DTT)	Applichem	
Ethanol, <i>p.a.</i>	Roth	
Ethidiumbromid	Roth	DNA / Klonierungen
Ethylendiamino-N,N'-tetraacetat (EDTA)	Roth	
Dinatriumsalz, <i>p.a.</i>		
Ethylenglycol-N,N'-tetraacetat (EGTA), <i>p.a.</i>	Roth	Cytomix
Ficoll	Sigma-Aldrich	RNA-AGE / Northern Blot
FM2-10	Invitrogen	Fluoreszenzmikroskopie
G418 (Neomycin) Disulfat	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Glycerin	Roth	
Glycin	Applichem	
Glycogen	Roche	DNA / Klonierungen
Glyoxal	Sigma-Aldrich	RNA-AGE / Northern Blot
Hefeextrakt	Roth	Bakterienkultivierung
Hemin	Serva	Trypanosomenkultivierung
Heparin	Sigma-Aldrich	
Hexamin-cobalt(III)-chlorid	Sigma-Aldrich	Bakterienkultivierung
Hygromycin B	Roth	Trypanosomenkultivierung
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen	Trypanosomenkultivierung
Kaliumchlorid, <i>p.a.</i>	Roth	
Kaliumdihydrogenphosphat, <i>p.a.</i>	Roth	
L-Cystein	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
L-Methionin	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung

Chemikalie	Firma	Verwendungszweck
Lachssperma DNA	Ambion	RNA-AGE / Northern Blot
Magnesiumchlorid-hexahydrat, <i>p.a.</i>	Roth	Bakterienkultivierung
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck	Bakterienkultivierung
Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat	Roth	Bakterienkultivierung
MEM (minimum essential medium)	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
MEM Vitamine	Invitrogen	Trypanosomenkultivierung
Methanol	Roth	SDS-PAGE / Western Blot
Morpholino-N-ethylsulfonat (MES)	Roth	Bakterienkultivierung
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Applchem	RNA-AGE / Northern Blot
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonat) (HEPES)	Roth	
Natriumacetat wasserfrei, <i>p.a.</i>	Roth	DNA / Klonierungen
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Natriumchlorid	Roth	
Natriumdihydrogenphosphat	Roth	
Natriumhydroxid	Roth	
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Paraformaldehyd	Merck	Fluoreszenzmikroskopie
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen	Trypanosomenkultivierung
Phleomycin	Cayla	Trypanosomenkultivierung
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich	RNA-AGE / Northern Blot
Puromycin-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Saccharose, <i>p.a.</i>	Roth	SDS-PAGE / Western Blot
Salzsäure, 37%	Roth	
SDS-Solution, 20%	Bio-Rad	RNA-AGE / Northern Blot
SDS, 20% Fertiglösung	Applchem	SDS-PAGE / Western Blot
Seaplaque-Agarose GTG	Biozym	DNA / Klonierungen
β-Mercaptoethanol	Roth	Trypanosomenkultivierung
Tetramethyldiamin (TEMED)	Applchem	SDS-PAGE / Western Blot
Tetranatriumpyrophosphat	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Tetrazyklin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Thymidin	Sigma-Aldrich	Trypanosomenkultivierung
Trichloressigsäurelösung (TCA)	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applchem	
Triton X-100		Fluoreszenzmikroskopie
Trypton / Pepton, <i>MB grade</i>	Roth	Bakterienkultivierung
Tween-20	Roth	SDS-PAGE / Western Blot
Wasserstoffperoxid	Roth	RNA-AGE / Northern Blot
Xylencyanol	Applchem	DNA / Klonierungen

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Kits**

Kit	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi / Maxi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
Nucleobond Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Miniprep Kit EasyPrep Pro	Biozym
Aurum Total RNA Mini Kit	Bio-Rad
DECAprime II Kit	Ambion
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

Primärantikörper	Typ	eingesetzte Verdünnung		Herkunft
		Immunofluoreszenz	Western Blot	
$\alpha$ -VSG221	Kaninchen, polyklonal	1:100	1:1.000	G. Cross
$\alpha$ -MITat 1.6		1:1.000		M. Carrington
$\alpha$ -GFP	Kaninchen, monoklonal	1:100	1:4.000	Molecular probes
$\alpha$ -HSP60	Maus, monoklonal		1:10.000	F. Bringaud
$\alpha$ -PFR	Maus, monoklonal	1:10	1:2000	K. Gull
$\alpha$ -p67	Maus, monoklonal	1:500		J. Bangs
$\alpha$ -Rab5A	Kaninchen, polyklonal	1:200		M. Field
$\alpha$ -Rab7	Kaninchen, polyklonal	1:500	1:100	M. Boshart
$\alpha$ -Tubulin	Kaninchen, polyklonal	1:20.000		K. Gull
$\alpha$ -BIP		1:500		J. Bangs
$\alpha$ -MBAP	Kaninchen, polyklonal	1:200		M. Engstler
Sekundär-antikörper	Typ			Herkunft
Ziege-anti-Maus-IgG	IRDye700-Konjugat		1:5.000	LI-COR
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	IRDye800-Konjugat		1:5.000	LI-COR
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Alexa FluorTM 680-Konjugat	1:5.000		Molecular probes
Ziege-anti-Maus-IgG	Alexa FluorTM 680-Konjugat	1:5.000		Molecular probes
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Alexa FluorTM 594-Konjugat	1:1.000		Molecular probes
Ziege-anti-Maus-IgG	Alexa FluorTM 488-Konjugat	1:1.000		Molecular probes
Fluoreszierende Chemikalien	Konzentration	eingesetzte Verdünnung		Herkunft
AMCA-Sulfo-NHS	100 mM in DMSO	1:100		Invitrogen
Streptavidin-Alexa594	100 mM in DMSO	1:100		Molecular probes



### 3.1.2. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Prozentangaben um Volumenprozent. Die Angabe des Verhältnisses Masse zu Volumen wurde durch das Kürzel (m/v) gekennzeichnet.

#### 3.1.2.1. Kulturmedien

HMI9 zur Kultivierung von monomorphen BSF Trypanosomen

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) für 1 l: 3,024 g NaHCO<sub>3</sub>; 136 mg Hypoxanthin; 82,2 mg Bathucoproinsulfonat; 0,2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 39 mg Thymidin; 100.000 u Penicillin; 100 mg Streptomycin; 182 mg Cystein; 10% FKS (nach Hirumi und Hirumi, 1989)

2x HMI9 zur Kultivierung von pleomorphen BSF Trypanosomen

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) für 1 l: 3,024 g NaHCO<sub>3</sub>; [total 862,5 ml] 204 mg Hypoxanthin; 123,3 mg Bathucoproinsulfonat; 0,3 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 58,5 mg Thymidin; 150.000 u Penicillin; 150 mg Streptomycin; 273 mg Cystein; 26% FKS

HMI9-Methylcellulose (HMI9-Mc) zur Kultivierung von pleomorphen BSF Trypanosomen

5,5 g Methylcellulose (Methocel, Fluka) in 183 ml ddH<sub>2</sub>O; nach Autoklavieren Zugabe von 320 ml 2xHMI9

Luria-Bertani Medium (LB Medium) zur Kultivierung von *E. coli*

10 g/l Baktotrypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7

LB-Agar

16 g Agar in 1 l LB-Medium

#### 3.1.2.2. Puffer und Lösungen

Cyclophosphamid zur Immunsuppression von Tieren

100 mg Cyclophosphamid

in 5 ml ddH<sub>2</sub>O (steril) gelöst; zeitnah verbrauchen

Citrat-Glucose-Antikoagulat

100 mM Natriumcitrat pH 7,7; 40 mM Glucose

Cytomix zur Elektroporation von Trypanosomen

10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,6; 2 mM EGTA; 120 mM KCl; 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM HEPES; 0.5% (m/v) Glucose; 1 mM Hypoxanthin; 100 µg/ml BSA

#### DNA-Ladepuffer

40% (m/v) Saccharose ; 0,1 M EDTA pH 8; 0.5% (m/v) Bromophenolblau; 0.5% (m/v) Xylencyanolblau

#### DND zur Transformation von Bakterien

1,53 g Dithiothreitol (DTT); 9 ml Dimethylsulfoxid (DMSO); 100 µl 1 M Kaliumacetat  
7,5 pH;  
auf *ddH<sub>2</sub>O* 10 ml *ddH<sub>2</sub>O*

#### EB-Puffer zur Zelllyse bei der Präparation von genomischer DNA

10 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.5% SDS

#### 2x Lämmli-Probenpuffer zur Präparation von Proteinextrakten aus Trypanosomen

120 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% (m/v) SDS; 20% (m/v) Glycerol; 2% β-Mercaptoethanol

#### Lämmli-Laufpuffer

25 mM Tris-Base; 200 mM Glycin; 3,46 mM SDS; pH 8,3

#### MOPS-Puffer

200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 80 mM Natriumacetat; pH 7,0; 1 mM EDTA

#### Natriumphosphat-Glycin-Puffer pH 7,2

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,1 M Glycin

#### 10x PBS

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl

#### PBS/BSA

PBS, 1% (w/v) BSA Fraktion V

8% (w/v) PFA

#### PFA

8 g Paraformaldehyd (PFA); in 0,1 M HEPES pH 7,2

#### SOB

20 g/l Baktotrypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl;  
10 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>

20x SSC

300 mM Natriumcitrat, pH 7; 3 M NaCl

10x TAE

400 mM Tris-HCl; 40 mM Natriumacetat pH 8,0; 1 mM EDTA

TBS/TBS-T

20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl;

für TBS-Tween (TBS-T): 0.05% Tween

TDB

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,7; 20 mM Glucose; 5 mM KCl; 80 mM NaCl;

1 mM MgSO<sub>4</sub>

TFB

10 mM MES-KOH pH 6,2; 100 mM KCl; 45 mM MnCl<sub>2</sub>; 3 mM Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>

Western Blot Anodenpuffer I

300 mM Tris-HCl, pH 10,4; 20% Methanol

Western Blot Anodenpuffer II

30 mM Tris-HCl, pH 10,4; 20% Methanol

Western Blot Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 9,4; 40 mM ε-Amino-Capronsäure; 20% Methanol

### **3.1.3. Verwendete Stämme und Zelllinien**

#### **3.1.3.1. Bakterienstämme**

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Stämme und deren Genotypen.

#### **3.1.3.2. Trypanosomenstämme**

Tabelle 6 führt die verwendeten Trypanosomenzelllinien auf.

Die Benennung der einzelnen Zelllinien erfolgte auf Basis des Serodems. Zusätzlich werden die Zelllinien durch die einzelnen Vektoren bezeichnet, die die transgene Expression ermöglichen. Induzierbare Expression tritt hierbei immer als Exponent des Serodems auf. Das Kürzel "tet" steht für die Induzierbarkeit durch Tetrazyklin, welche auf den Vektoren pLew13 und pLew90 beruht. M1.2<sup>tet</sup> bezeichnet also die Zelllinie "MITat 1.2 13-90". Die

**Tabelle 5: verwendete Bakterienstämme**

Bezeichnung	Genotyp	Verwendung
DH5α	<i>F<sup>-</sup>, ψ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), phoA, supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Amplifikation von Standardplasmiden
<i>E. coli sure</i>	<i>F'[ proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10], recB, endA1, glnV44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recJ, sbcC, umuC::Tn5, uvrC, e14<sup>-</sup>, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171</i>	Amplifikation von Standardplasmiden
K12 Stamm TG1	<i>Δ(lac, -proAB)(F', traD, proA+B, lacIq, Z<sup>-</sup>, ΔM15) recO, supE, thi, hsd D5</i>	Amplifikation von Standardplasmiden; höhere Transformationseffizienz durch die Methode nach Hanahan

**Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Trypanosomenzelllinien**

<i>Trypanosoma</i>	Serodem		verwendete Bezeichnung
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	AnTat 1.1	Antwerpen Trypanozoon antigen type 1.1	A1.1
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	MITat 1.2	Molteno Institute Trypanozoon antigen 1.2	M1.2
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	MITat 1.2	MITat 1.2 13-90 Klon 6	M1.2 <sup>tet</sup>

anschließenden Kürzel sind nach dem Prinzip ‚*Vektorkürzel.Fusionsproteinkürzel*‘ aufgebaut. Der Vektor wird gegebenenfalls noch durch die zusätzliche Angabe des Selektionsgens eindeutig benannt. Die Fusionsproteine bestehen zunächst aus der Abkürzung für das zugrundeliegende Protein und direkt angehängt aus der Abkürzung für den verwendeten Fluoreszenzmarker.

Konstitutive transgene Expression wird als Index aufgeführt und folgt demselben Aufbau. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die verwendeten Kürzel und Selektionsgene.

### 3.1.4. Technische Ausstattung

#### 3.1.4.1. Geräteausstattung

Tabelle 8 enthält eine Übersicht über die verwendeten Spezialgeräte.

#### 3.1.4.2. Computerprogramme, Datenbanken und Internetplattformen

BLAST-Suchen im Genom von *T. brucei* wurden mit der Datenbank TIGR durchgeführt ([www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1/)). Als Algorithmus wurde „gonnet“ verwendet. Der systematische Name des jeweiligen Gens dient zur Identifizierung. Wenn möglich wurde die Sequenz von MITat427 verwendet. Da das Genom aber nicht vollständig sequenziert ist, wurde gegebenenfalls auf die Sequenz von TREU927 zurückgegriffen (Gensequenzen Tb927).

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren, Gene und fluoreszierenden Marker mit ihrer Herkunft sowie den verwendeten Bezeichnungen**

Vektor	Insert	Herkunft	Expression
pKD4	K	Muñoz-Jordan <i>et al.</i> , 1996	konstitutiv
pLew82	L82	Wirtz <i>et al.</i> , 1999	induzierbar
pLew20	L20	Wirtz <i>et al.</i> , 1999	induzierbar
pTsarib(hyg)	Th	Xong <i>et al.</i> , 1998	konstitutiv
pTsarib(blas)	Tb	-	konstitutiv
pTsarib(puro)	Tp	-	konstitutiv
p2T7	R	LaCount <i>et al.</i> , 2000	induzierbar
pLew90	L90	Wirtz <i>et al.</i> , 1999	konstitutiv
pLew13	L13	Wirtz <i>et al.</i> , 1999	konstitutiv
pXS5	-	J. Bangs	konstitutiv
<b>Reportergene</b>			
GRASP	G	G. Warren	
GntB	Gn	G. Warren	
p67	67	J. Bangs	
VSG'Y'	VY	-	
tVSG117	117	-	
EP1	E	-	
<b>Fluoreszierende Marker</b>			
EGFP	G	Clontech	
YFP	Y	Clontech	
DsRed II	R	Clontech	

**Tabelle 8: Besondere Geräte**

Gerät	Firma
Axiophot 2	Carl Zeiss, Jena
Bio-Link BLX E254	Vilber Lourmat
Electro Cell Manipulator 630	BTX Harvard Apparatus, Holliston USA
Gel iX Imager	INTAS, Göttingen
iMIC	TILL Photonics/Agilent Technologies, Gräfelfing
Nanodrop 2000c	Thermo
Odyssey Infrarot Scanner	Li-cor, Lincoln USA
Semi Dry Elektrobloetter	OWL
Spectrophotometer Spectronis 601	Milton Roy
Speedvac RC 1009	Jouan
UV Transilluminator Bio-View 365 nm	Bio-Step

Entsprechende Suchen bezüglich des humanen Genoms wurden beim *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) durchgeführt. Zur Identifikation dient die Lokusangabe der Proteindatenbank.

Für die Durchführung von Alignments wurde auf den Algorithmus *clustalx* zurückgegriffen ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), alle Proteinalignments wurden mithilfe der *gonnet*-Matrix durchgeführt. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die verwendeten Datenbanken sowie weitere spezifische Software.

**Tabelle 9: verwendete Spezialsoftware und Datenbanken**

Programm	Firma
4Peaks	Macentosj, Aalsmeer (Niederlande)
BioX 1.5	E. Lagerkrantz (www.lagercrantz.ath.cx)
Endnote X2	Thomson Reuters, New York (USA)
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Gene Construction Kit 2.5	Textco, New Hampshire (USA)
Gene Inspector	Textco, New Hampshire (USA)
GeneDB (www.genedb.org)	Sanger Institute, Cambridge (UK)
Huygens Essential 3.4 Software	Scientific Volume Imaging, Milversum (Niederlande)
ImageJ	open source (wsr.nih.gov)
Imaris 6.2.1	Bitplane AG, Zürich (Schweiz)
IPLab 3.9.1	Scanalytics, Fairfax (USA)
jMic2	N. Heddergott
LA Aquisition	TILL Photonics/Agilent Technologies, Gräfelfing
NCBI-Genomdatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov)	National Institute of Health, (USA)
Odyssey	Li-cor, Lincoln (USA)
Oligo 6	National Biosciences, Plymouth
Papers	Macentosj, Aalsmeer (Niederlande)
Prism4	GraphPad Software, La Jolla (USA)
SMART (smart.embl-heidelberg.de)	EMBL Heidelberg
TIGR (www.tigr.org/db.shtml)	The Institute for Genomic Research (TIGR) / J. Craig Venter Institute

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. *Trypanosoma brucei***

#### **3.2.1.1. Kultivierung von monomorphen Blutstromtrypanosomen**

Monomorphe Blutstromformen von *T. brucei* wurden bei 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und H<sub>2</sub>O-Sättigung in Suspensionskultur gehalten. Grundsätzlich wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, d. h. bei Zelldichten von weniger als 1 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml gehalten. Bei der Verwendung von durch Tetrazyklin induzierbaren Zelllinien wurde eine Zelldichte von 8 × 10<sup>5</sup> Zellen/ml nicht überschritten. Die Zelldichten wurden mit Neubauer Zählkammern in Mehrfachbestimmung ermittelt.

BSF wurden grundsätzlich 10 Minuten bei 1.400 × g zentrifugiert. Prozyklische Trypanosomen wurden 10 Minuten bei 900 × g zentrifugiert. Sofern nicht anders vermerkt wurde bei 4 °C zentrifugiert.

#### ***Limiting dilution* von monomorphen Trypanosomen**

Bei stark differierenden Expressionsniveaus der fluoreszierenden Proteine wurde die gemischte Zellpopulation auf eine Konzentration von zwei Zellen pro ml Kultur verdünnt und anschließend in 96er-Mikrotiterplatten kultiviert. Die Auswahl der geeigneten klonalen Zelllinien erfolgte entsprechend dem Vektor und dem Gen, das in die Zellen transfiziert worden war.

### **Einfrieren von monomorphen Trypanosomen**

Monomorphe Trypanosomen wurden bei 4 °C bei 1400 × g abzentrifugiert und anschließend in 4 °C kaltem Einfriermedium (90% HMI9, 10% Glycerol) aufgenommen. Nach Aliquotierung wurden die Stabilate zur schonenden Abkühlung in einem Stratacooler bei -80 °C eingefroren. Nach spätestens vier Wochen wurden die Stabilate in flüssigem Stickstoff gelagert. Prozyklische Trypanosomen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  Zellen pro Aliquot eingefroren.

### **3.2.1.2. Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen**

#### **Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen auf Agarplatten**

Zur Herstellung von HMI9-Agarose wurden 1,3 g *Seaplaque* GTG-Agarose in 73 ml ddH<sub>2</sub>O autoklaviert. Nach Abkühlen auf 37 °C wurden 127 ml 2xHMI9 dazugegeben. Die HMI9-Agarose (jeweils 20ml) wurde in Petrischalen gegossen und etwa 30 Minuten offen in einer sterilen Werkbank getrocknet. Zwischen  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in einem Volumen von etwa 200 µl auf die Platte gegeben und mit einem sterilen Drigalski-Spatel vorsichtig ausplattiert.

Zur Zellernte wurden die Zellen mit HMI9 von der Platte geschwemmt und je nach Bedarf weiterverwendet.

#### **Anzucht von pleomorphen Trypanosomen in Nagern**

Zur Anzucht von pleomorphen Trypanosomen wurden ausgewachsene Wistar-Ratten sowie *balb/c* Mäuse verwendet.

Etwa 6-12 h vor der Infektion mit Trypanosomen wurden die Tiere durch Injektion von 0,75 ml / 100 g Körpergewicht Cyclophosphamid (20 mg/ml *i.p.*) immunsupprimiert.

Zur Infektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in eine Ratte bzw.  $2-5 \times 10^5$  Zellen in eine Maus *i.p.* injiziert. Die maximalen Injektionsvolumina betrugen 2 ml für eine Ratte und 0,5 ml für eine Maus.

Der Verlauf der Parasitämie wurde durch regelmässige Schwanzblutentnahme überprüft. Sobald die Trypanosomen eine Zelldichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml erreichten, wurde das Tier mittels CO<sub>2</sub> getötet und direkt anschließend eine Thorakotomie durchgeführt. Nach Durchtrennung der *Vena Cava* wurde das Blut der Tieres durch Injektion von 5 ml Citrat-Glucose-Antikoagulat in die linke Herzkammer ausgeschwemmt und mit einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen. Das Blut wurde sofort 1:3 in Citrat-Glucose-Antikoagulat aufgenommen und bei 37 °C und 1400 × g abzentrifugiert. Die Trypanosomen befinden sich nach der Zentrifugation im *buffy coat* zwischen Erythrozyten und Serum. Bis auf 1-2 ml wurde das Serum abgenommen und die Trypanosomen, nicht aber die Erythrozyten vorsichtig resuspendiert. Für Transfektionen wurden die Zellen unverzüglich in 10 ml Cytomix aufgenommen, gezählt und die Transfektion danach wie mit monomorphen



Trypanosomen durchgeführt. Überschüssige Zellsuspensionen wurden direkt mit doppelt-konzentriertem Einfriermedium versetzt und eingefroren.

### **Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen in Flüssigkultur**

Pleomorphe LS BSF wurden nach der Transfektion bis zu 14 Tage in HMI9-Methylcellulose kultiviert. Die Zelldichte und Zellmorphologie wurde protokolliert und die Zellen entweder eingefroren oder direkt in Nager injiziert.

### **Einfrieren von pleomorphen Trypanosomen**

Pleomorphe Trypanosomen wurden bei 4 °C abzentrifugiert und das Restvolumen an HMI9-Methylcellulose bestimmt. Zu den Zellen wurde ein Volumen doppelt konzentriertes Einfriermedium (80% HMI9, 20% Glycerol) gegeben und die Zellen aliquotiert. Nach Einfrieren in einem Stratacooler bei -80 °C wurden die Stabilate nach etwa 4 Wochen in flüssigen Stickstoff transferiert. Die Stabilate beinhalteten in der Regel  $2 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen.

### **3.2.1.3. Transfektion von BSF**

Nach Ermittlung der Zelldichte einer logarithmisch wachsenden Kultur wurde ein geeignetes Volumen mit  $1 \times 10^7$  Zellen pro geplanter Transfektion bei 37 °C abzentrifugiert und in 100 ml vorgewärmten Cytomix-Puffer gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation wurden die Zellen in einem Volumen von 400 µl Cytomix pro Transfektionsansatz resuspendiert. 400 µl dieser Zellsuspension mit  $1 \times 10^7$  Zellen wurde zu 10 µg linearer DNA gegeben und sofort anschließend elektroporiert (BTX 630; 1,5 kV, 175 Ω, 25 µF). Anschließend wurde die Zellen zu 50 ml Flüssigmedium gegeben und für 16-20 h inkubiert, bevor das selektierende Antibiotikum zugegeben wurden. Antibiotika, gegen die die jeweilige Zelllinie bereits eine Resistenz aufwies, wurden durchgängig zu der Kultur gegeben. Pleomorphe BSF wurden nach Transfektion in 200 ml Methylcellulose-HMI9 aufgenommen.

Um eine spätere Klonierung durch *limiting dilution* zu vermeiden und die Kultivierungszeiten zu verkürzen wurden in Einzelfällen die frisch transfizierten Zellen sofort nach Transfektion in 25 ml HMI9 aufgenommen und in 1 ml Aliquots auf eine 24er Mikrotiterplatte aufgeteilt. Die Zugabe des selektierenden Antibiotikums erfolgte ebenfalls 16-20 h nach Transfektion, wobei das Antibiotikum in doppelter Endkonzentration in HMI9 verdünnt wurde und zu jedem Aliquot der transfizierten Zellen dasselbe Volumen an HMI9 mit Antibiotikum gegeben wurde. Die Endkonzentration an selektierendem Antibiotikum in den Aliquots entsprach der Konzentration bei der Kultivierung in 50 ml Kulturen.

Je nach Verdopplungsgeschwindigkeit der verwendeten Zelllinien waren resistente Populationen nach 4-6 Tagen sichtbar.

Bei der Verwendung des Elektroporationsgerätes AMAXA wurden die Transfektionslösung "T-cell 1" verwendet und die Elektroporation nach Empfehlungen des Betreibers durchgeführt. In einem Ansatz wurden  $3 \times 10^7$  Zellen mit 10 µg linearisierter DNA elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden 1:10, 1:10<sup>2</sup> und 1:10<sup>3</sup> verdünnt. Da auf unabhängige Zelllinien Wert gelegt wurde, wurden die Zellen sofort nach Transfektion auf Mikrotiterplatten aliquotiert.

### **Auftauen von Trypanosomenstabilaten**

Stabilate wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 10 ml vorgewärmtem HMI9 gewaschen, um das Glycerol zu entfernen. Nach 1 h Inkubation in 10 ml HMI9 bei 37 °C wurde die Zellzahl bestimmt und das Kulturvolumen angepasst, bevor die selektierenden Antibiotika zugegeben wurden.

### **Oberflächenfärbung lebender Zellen mit AMCA-Sulfo-NHS**

Der Fluoreszenzfarbstoff AMCA-Sulfo-NHS bindet durch die Sulfo-NHS-Gruppe kovalent an primäre Amine. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei 347 nm.

Trypanosomen wurden bei  $1.400 \times g$  für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, zweimal mit eiskaltem TDB gewaschen und mit TDB auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Die Inkubation mit 1 mM AMCA-Sulfo-NHS erfolgte für 10 Minuten auf Eis im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem TDB gewaschen.

### **Anfärbung von Trypanosomen mit FM2-10**

FM2-10 ist ein Farbstoff, der in lebenden Zellen in die äußere Phospholipidschicht von Membran integriert. In der lipophilen Umgebung entstehen die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes, wobei das Absorptionsmaximum bei 506 nm, das Emissionsmaximum bei 620 nm liegt. Trypanosomen wurden bei  $1.400 \times g$  für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und zweimal mit eiskaltem TDB gewaschen. Nach vollständiger Abkühlung der Zellen auf Eis erfolgte die Inkubation mit 100 µM FM2-10 für 2 Minuten auf Eis.

#### **3.2.1.4. Immunofluoreszenzanalysen**

Mindestens  $5 \times 10^6$  Zellen wurden zentrifugiert und einmal mit 4 °C kaltem TDB gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 300 bis 1000 µl TDB aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an 8% Paraformaldehyd dazugegeben und die Probe mehrfach vorsichtig invertiert. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 4 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden bei  $900 \times g$  abzentrifugiert und einmal mit PBS oder TDB gewaschen. Für Langzeitlagerung wurden die Zellen mit 0,02% Azid versetzt.

Zur Detektion von Proteinen, die innerhalb von Organellen liegen, wurden die Zellen zunächst permeabilisiert. Dazu wurden sie für 15 Minuten in 500 µl Natriumphosphat-Glycin-Puffer pH 7,2 inkubiert. Anschließend wurden 500 µl PBS, 0,2% Triton X-100 hinzugegeben und die Zellen für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden chemisch fixierte Trypanosomen zweimal mit PBS gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C statt. BSF wurden bei  $1100 \times g$  und PCF bei  $600 \times g$  zentrifugiert, um die Zellstrukturen nicht zu beschädigen. Grundsätzlich wurden die Zellen sehr vorsichtig durch leichte Agitation des Reaktionsgefäßes resuspendiert.

Vor der Zugabe des Primärantikörpers wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen und anschließend der Primärantikörper in entsprechender Konzentration dazugegeben. Die verwendeten Verdünnungen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Nach mindestens 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen wiederum zweimal mit PBS/BSA gewaschen und anschließend mit dem spezifischen Sekundärantikörper mindestens 1 h im Dunkeln inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS/BSA und zwei weiteren Waschschriften mit reinem PBS wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert und danach unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

#### **3.2.1.5. Endozytose von biotinyliertem VSG**

Um die Lokalisation von endozytiertem VSG in Trypanosomen sichtbar zu machen, wurden lebende Zellen nach einmaligem Waschen mit eiskaltem TDB in 1,5 ml TDB mit 15 µl Sulfo-NHS-SS-Biotin (100 mM in DMSO) versetzt und die Biotinylierungsreaktion nach 10 Minuten durch die Zugabe von 15 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit TDB bei strikter Kühlung wurde die Endozytose durch die Zugabe von 200 µl 27 °C warmem TDB zu 50 µl Zellen für bis zu 2 Minuten ermöglicht. Direkt anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 250 µl 8% PFA fixiert. Die Detektion des Biotins erfolgte wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben durch Streptavidin-Alexa594.

#### **3.2.1.6. Fluoreszenzmikroskopische Analyse**

Zur Fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden 2-3 µl Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Die Aufnahmen wurden mithilfe des Programms LA Aquisition von TILL Photonics gemacht. Für Stack-Aufnahmen wurden 150 einzelne Aufnahmen im Abstand von 100 nm gemacht und anschließend die Aufnahme mit dem zweiten Filter und der jeweiligen Anregungswellenlänge wiederholt. Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der ImageJ-Software. In Einzelfällen wurde eine Dekonvolution der Daten durch die Huygens Essential 3.4 Software vorgenommen.

### **3.2.2. Biochemische Analysen**

#### **3.2.2.1. Herstellung und Analyse von Gesamtproteinextrakten aus *T. brucei***

Für Gesamtzellextrakte aus Trypanosomen wurde eine genau bestimmte Anzahl an Zellen geerntet. Nach einmaligem Waschen bei 4 °C mit TDB wurde das Sediment gewogen und mit TDB auf das halbe Zielvolumen gebracht. Die Endkonzentration der Lysate betrug  $1 \times 10^5$  Zellen/ $\mu$ l. Nach Resuspension wurde das gleiche Volumen 2x Lämmli-Probenpuffer zugegeben und die Zellen 5 Minuten bei 100 °C gekocht. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt und nach Bedarf sofort auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen oder bei -20 °C gelagert. In den meisten Fällen wurden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zelläquivalente für die SDS-PAGE verwendet.

#### **Auftrennung von Proteinen auf diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen**

Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-(30:0,8)-Konzentration von 10 bis 20% gewählt. Als Standard wurden 12,5%ige Gele verwendet. Das Trenngel beinhaltete 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,033% Ammoniumpersulfat und 0,67% Tetramethyldiamin. Das Sammelgel beinhaltete 5% Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumpersulfat und 0,1% Tetramethyldiamin.

Nach der Polymerisierung des Geles wurde das Gel mit maximal 10  $\mu$ l beladen. Als Proteinmarker wurde See Blue™ Pre-stained Standard von Novex verwendet. Es wurde eine Spannung von 130 V angelegt. Die Elektrophorese wurde durchgeführt, bis das Bromphenolblau aus dem Gel austrat.

#### **Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau**

Polyacrylamidgele wurden in Coomassie-Lösung (0,1% Coomassie Brilliant Blau R250, 10% Eisessig, 50% Methanol) für 10 Minuten gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (5% Methanol, 7% Eisessig) inkubiert, bis das Gel keine Hintergrundfärbung mehr aufwies. Die Coomassie-Färbung wurde über den Gel iX Imager dokumentiert.

#### **Immobilisierung von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)**

Der Transfer von auf PVDF- oder Nitrozellulose-Membranen erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen 1984). Vor dem Blotaufbau wurden passgenau geschnittene Filterpapiere (Whatman) in den jeweiligen Puffern getränkt. Bei der Verwendung von PVDF-Membranen wurde diese kurz vorher für 1 Minute in Methanol aktiviert und mit  $ddH_2O$  getränkt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: sechs Whatmanpapiere 3mm mit Kathodenpuffer getränkt, Membran, SDS-Gel, drei

Whatmanpapiere mit Anodenpuffer II und sechs Whatmanpapiere mit Anodenpuffer I. Zum Elektrottransfer wurde durch den Semi Dry Elektroblotter für 1 h eine Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> angelegt. Die Transfereffizienz wurde durch Coomassiefärbung des Geles nach dem Blotvorgang überprüft.

### **Detektion von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen**

Um Proteine auf Membranen spezifisch nachzuweisen, wurde die Membran zunächst in PBS/5% Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur in PBS mit 0,1% Tween-20/1% Magermilchpulver. Danach wurde die Membran in PBS mit 0,2% Tween-20 viermal für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde unter Lichtausschluss mit spezifischen Sekundärantikörpern in PBS mit 0,1% Tween-20 und 1% Magermilchpulver inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS mit 0,2% Tween-20 unter Lichtausschluss wurde die Membran einmal für 5 Minuten in PBS gewaschen, und entweder nass oder nach Trocknen mit dem Odyssey Infrarot Scanner (LI-COR) eingelesen. Die Quantifizierung der Banden erfolgte durch die Analysesoftware von Odyssey.

#### **3.2.2.2. Isolierung von genomischer DNA aus *T. brucei***

Um genomische DNA aus *T. brucei* zu isolieren, wurden zwischen  $2,5 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  Zellen nach Zentrifugation mit PBS gewaschen und in 500 µl EB-Puffer augenommen, der 100 µg Proteinase K enthielt. Nach Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h wurden die Proteine mit Phenol extrahiert. Dafür wurden 1 ml wassergesättigtem Phenol (pH 8) wurde zugegeben und die Probe 10 Minuten durch einen Überkopfschüttler invertiert. Anschließend wurde 5 Minuten lang bei  $20.000 \times g$  zentrifugiert und die wässrige (obere) Phase wurde vorsichtig abgenommen. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde die Prozedur wiederholt. Durch Zugabe von Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) wurden anschließend die Phenolreste in der Lösung entfernt. Anschliessend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit einem Volumen Isopropanol und 1/25 Volumen 5 M NaCl 20 Minuten bei  $20.000 \times g$  gefällt und mit 70%igen Ethanol gewaschen.

#### **3.2.2.3. Nachweis von RNA**

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde grundsätzlich autoklaviertes ddH<sub>2</sub>O benutzt und ausschließlich Glasware benutzt, die für 3 h bei 180 °C gebacken worden war.

#### **Isolierung von RNA aus *T. brucei***

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. brucei* wurden pro Probe  $5 \times 10^7$  Trypanosomen abzentrifugiert und mit kaltem TDB gewaschen und nochmals 10 Minuten bei  $1.400 \times g$

und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Präparation bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte mit dem RNAeasy Mini Kit von QIAGEN. Das Zellpellet wurde bei 37 °C mit 600 µl RLT-Puffer und 6 µl Mercaptoethanol resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl 70% Ethanol zugegeben und die Probe auf die Präparationssäule gegeben. Nach 15 sec Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit RW1-Puffer gewaschen und abermals zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und nach einer doppelten Zentrifugation für 15 sec zu Trocknung der Säulenmatrix die RNA zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und beide Fraktionen vereinigt. Die Konzentration der Proben wurde mit einem Nanodrop-Messgerät doppelt bestimmt.

### **Auftrennung von RNA durch Gelelektrophorese**

1,4 g Agarose wurden in 98 ml *ddH*<sub>2</sub>O aufgekocht und auf 50 °C abgekühlt. Nach Hinzufügung von 1 ml 50x RNA-Puffer und vorsichtiger Durchmischung wurde das Vertikalgel in der vorgesehenen Appatur mit einer Dicke von 2 mm gegossen und 45 Minuten bei Raumtemperatur belassen, bevor der Kamm entfernt wurde.

Die RNA-Proben wurden einheitlich auf eine Konzentration von 0,75 µg/µl verdünnt. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Proben der RNAi-Zelllinien M1.2<sup>tet R.αCOP</sup><sub>K.EG</sub>, M1.2<sup>tet R.Rab5B</sup><sub>K.EG</sub> und M1.2<sup>tet R.STT3</sup><sub>K.EG</sub>, die auf eine Konzentration von 1 µg/µl gebracht wurden. Es wurden jeweils 4 µl der RNA-Probe mit 7,2 µl Glyoxal-Lösung (75,4% DMSO; 21,55% Glyoxal; 15 mM Natriumphosphat, pH 6,9) vermischt und 40 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die RNA-Probe wurde direkt anschließend auf das Agaroesgel aufgetragen und die Gelelektrophorese bei leichter Umwälzung des Elektrophorespuffers mit einer peristaltischen Pumpe für 90 Minuten bei 90 V durchgeführt.

### **Immobilisierung von RNA auf Membranen (Northern Blot)**

Der Transfer der RNA auf die PVDF-Membran erfolgte mittels Kapillarblot. Die Durchführung erfolgte wie von (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben mit 20x SSC als Blotpuffer und über Nacht. Die RNA wurde in einem Cross-Linker mit 1200 × 100 µJ/cm<sup>2</sup> an die PVDF-Membran gebunden.

### **Detektion von RNA auf PVDF-Membranen**

Zur Detektion von RNA auf PVDF-Membranen wurde zunächst durch Restriktionsverdau und Gelextraktion die Sonde mit der zu detektierenden Sequenz hergestellt. Die Konzentration der isolierten Fragmente wurde mittels des Nanodrop 2000c gemessen. Zur Herstellung der radioaktiv-markierten Sonden wurde das DECAprime II Kit (Ambion) verwendet.

Die Membranen wurden nach Trocknen zwischen zwei Filterpapieren 2 h mit 50 ml SSC/ Denhardts-Hybridisierungspuffer inkubiert und bei 65 °C unter vertikaler Rotation in geschlossenen Hybridisierungsschalen prähybridisiert. Anschließend wurde die Sonde direkt nach dem Aufkochen bei 90 °C in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierungsschalen wurden über nacht bei 65 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Blots drei Mal für jeweils 20 Minuten in 0,1x SSC/0,1% SDS bei 60 °C gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Blots 1 h zwischen Filterpapier getrocknet und anschließend in einer Filmkassette mit einem Film bei -80 °C inkubiert. Die Expositionsdauer betrug je nach Signalstärke zwischen 6 Stunden und 28 Tagen. Die Filme wurden mit einer Filmentwicklungsmaschine Curix 60 von AGFA durchgeführt.

Zur Quantifizierung der einzelnen Proben wurde anschließend ohne den Blot zu stripfen eine Hybridisierung mit einer Sonde für die rRNA wie oben beschrieben durchgeführt. Die Exposition für diese Sonde betrug durchgängig 6 Stunden.

### **3.2.3. Arbeiten mit Bakterien**

#### **3.2.3.1. Transformation von *E. coli***

##### **Herstellung von elektrokompenten *E. coli***

Eine logarithmisch wachsende *E. coli*-Kultur (OD600 zwischen 0,3 und 0,6) wurde zunächst 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4.000 × g und 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen wurden 30 Minuten lang in 500 ml sterilem, eiskaltem ddH<sub>2</sub>O schonend auf einem Vertikalschüttler resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendierung wurden dreimal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 25 ml 10% Glycerol aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die eingefrorenen Zellen wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

##### **Elektroporation von *E. coli***

Elektrokompente Zellen (40 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und in eine Küvette (BTX, 2 mm Elektrodenabstand) gegeben. Die Elektroporation wurde mit 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω ausgeführt. Die frisch elektroporierte Zellsuspension wurde vorsichtig in 600 µl SOB-Medium transferiert und für 45 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 200 µl des Ansatzes ausplattiert und die verwendeten Glaskugeln auf einer weiteren Agaroseplatte für einen Zweitausstrich benutzt.

Bei der Verwendung von einem neu hergestellten Ansatz an elektrokompenten Zellen wurde mit 1 ng pBSK elektroporiert und die Transformationseffizienz ermittelt.



### **Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* für Standardtransformationen**

500 ml einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur (OD600 zwischen 0,3 und 0,6) wurden bei  $4.000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen wurden auf schmelzendem Eis in 50 ml eiskaltem  $0,1\text{ M CaCl}_2$  resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mindestens 20 Minuten auf Eis belassen und anschließend zentrifugiert ( $4.000\text{ g}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 Minuten). Schließlich wurden die Zellen in 10 ml sterilem  $0,1\text{ M CaCl}_2$  15% Glycerol aufgenommen und aliquotiert. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Standardtransformation von Plasmiden in *E. coli***

$\text{CaCl}_2$ -kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden vorsichtig zu  $4\text{ }\mu\text{l}$  des Plasmides gegeben und die Probe 30 Minuten bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  belassen. Anschließend wurde die Probe exakt 2 Minuten lang bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert.

### **Chemische Transformation von Ligationsprodukten in *E. coli***

Um die Transformationseffizienz bei Ligationen zu erhöhen, wurde in den meisten Fällen auf eingefrorene Bakterienstabilate mit niedrigerer Kompetenz verzichtet und die Bakterien direkt vor Benutzung präpariert (Hanahan *et al.*, 1991). *E. coli* TG-1 Zellen wurden frisch in SOB-Medium angeimpft. Pro Transformation wurden 2,5 ml Kultur angesetzt. Die Zellen wurden bis zu einer OD600 zwischen 0,3 und 0,6 bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die Kultur für 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 10 Minuten bei  $2000 \times g$  zentrifugiert. Die Zellen wurden in TFB (1/3 Volumen der ursprünglichen Kultur) resuspendiert und für weitere 15 Minuten auf Eis belassen.

Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei  $2000 \times g$  wurden die Zellen in insgesamt 0,2 ml TFB/ 2,5 ml Kultur resuspendiert und  $7\text{ }\mu\text{l}$  DND/ 2,5 ml Kultur zugesetzt. Nach 10 Minuten auf Eis wurde die gleiche Menge DND ein zweites Mal zugesetzt und die Kultur wieder 10 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurden jeweils  $210\text{ }\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf die jeweiligen Ligationsansätze (max  $20\text{ ng DNA}$ ) gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  (105-120 sec) wurden die Zellen noch einmal für 10 Minuten auf Eis inkubiert.  $150\text{ }\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten aufgetragen.

#### **3.2.3.2. Plasmidisolierung**

Je nach benötigter Menge und Reinheit der Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien angewendet.

Geringe Mengen ohne hohe Anforderungen an die Reinheit zum Screening von Plasmiden wurden nach alkalischer Lyse isoliert (Sambrook *et al.*, 1989).

Geringe Mengen mit höheren Anforderungen an die Reinheit für Sequenzierungen oder PCR wurden mithilfe des Miniprep Kit EasyPrep Pro (Biozym) isoliert. Größere Mengen mit hohen Anforderungen an die Reinheit zur Transfektion von *T. brucei* wurden mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) und dem NucleoBond Xtra Midi / Maxi Kit (Macherey-Nagel) isoliert.

### **3.2.3.3. Bakterienstabilate**

Zur Herstellung von Stabilaten zur dauerhaften Lagerung wurde eine 1 ml einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur mit dem gleichen Volumen Glycerolpuffer (25 mM TrisHCl, pH8; 65% Glycerol; 0,1 M MgSO<sub>4</sub>) versetzt und bei -80 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden Zellen neu ausgestrichen und weiterkultiviert.

## **3.2.4. Molekularbiologische Arbeiten**

### **3.2.4.1. Agarose Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden mittels Flachbett-Gelelektrophorese aufgetrennt. DNA-Proben wurden im Verhältnis 9:1 mit DNA-Ladepuffer gemischt. Für DNA-Fragmente von über 400 bp wurde eine Konzentration von 0,8% Agarose in 1x TAE eingesetzt, für die Präparation von kleineren DNA-Fragmenten (bis 800 bp) wurden 1,5% Agarosegele in 1x TAE eingesetzt. Vor dem Erstarren der Agarose wurde 10 ng/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Es wurde eine Spannung von 10 V/ cm Gellänge angelegt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde unter UV-Licht (350 nm) überprüft und mit dem Gel iX Imager dokumentiert. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit dem 1 kb DNA-Marker (Fermentas) und 100 bp DNA-Marker von MBI ermittelt.

### **Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente in Agarosegelen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und in einem kleinen Gel-Block ausgeschnitten. Mittels der Gelextraktionskits QIAEX II (QIAGEN) oder NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) wurde die DNA aus dem Gel-Block aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration der erhaltenen Fragmente nach Gelelektrophorese eines Aliquots durch Vergleich mit dem 1 kb DNA-Marker (Fermentas) abgeschätzt.

### **3.2.4.2. Modifikation von DNA**

Die Modifikation von DNA durch Enzyme wurde nach Vorschrift des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Zum Auffüllen von DNA-Überhängen wurde das große Klenow-Fragment verwendet, das Entfernen von 3'-Überhängen wurde durch die T4-DNA-Polymerase erzielt.

Die Herstellung der einzelnen Plasmide wird in Kapitel 4 jeweils bei den einzelnen Punkten dargestellt. Während die Verwendung des Klenow-Fragmentes nicht jedes Mal aufgeführt wurde, wurde die Verwendung der *T4*-DNA-Polymerase jedes Mal mit aufgeführt, so dass sich aus den Beschreibungen der einzelnen hergestellten Plasmide eine eindeutige Prozedur ergibt.

Die Dephosphorylierung von Vektorfragmenten erfolgte 1 h lang bei 37 °C mit der *calf intestine phosphatase*. Anschließend wurde das Fragment entweder durch Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion oder direkt durch Phenolextraktion aufgereinigt. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift der Hersteller. Die Behandlung mit beiden Enzymen wird nicht einzeln im Text erwähnt, sondern nur in den jeweiligen Übersichtsgrafiken aufgeführt.

### DNA-Ligation

Nach Präparation von Vektor und *insert* mit korrespondierenden DNA-Enden wurde die Ligation durchgeführt. Hierzu wurden 50 ng geschnittener Vektor mit der dreifachen molaren Menge an *insert* gemischt und in insgesamt 20 µl Ligationsansatz mit 2.000 u T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor Elektroporation von Bakterien wurde der Ansatz gefällt und in 20 µl *ddH<sub>2</sub>O* aufgenommen. Für die chemische Transformation war dies nicht notwendig und die Transformation wurde direkt ohne weiteren Reinigungsschritt durchgeführt.

### 3.2.4.3. Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation und zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Für analytische Anwendungen wurde die *Taq*-Polymerase, für alle anderen Anwendungen korrekturlesende Polymerasen eingesetzt (siehe Tabelle 10). Es wurden 10 pMol der Primer eingesetzt, ansonsten wurden die Empfehlungen des Herstellers befolgt. Die optimale Temperatur für das *annealing* wurde mit dem Programm Oligo 6 berechnet. Bei der Verwendung von genomischer DNA als *template*

**Tabelle 10: DNA-modifizierende Enzyme**

Enzym	Verwendungszweck der Enzyme	Firma
großes Klenow-Fragment	Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen	NEB
<i>T4</i> -DNA-Polymerase	Zurückschneiden von 3'-DNA-Überhängen	NEB
<i>calf intestine phosphatase</i>	Dephosphorylierung von DNA-Enden	NEB
<i>T4</i> -DNA-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	NEB
Expand <sub>™</sub> <i>high fidelity</i>	Polymerasekettenreaktion	Böhringer
Expand <sub>™</sub> <i>long template</i>	Polymerasekettenreaktion	Böhringer
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Polymerasekettenreaktion	NEB
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Polymerasekettenreaktion	NEB

wurde 1 µg DNA eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden entweder durch Isopropanol-Fällung oder dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) gereinigt oder direkt auf einem Agarosegel aufgetrennt und durch Gelextraktion wiedergewonnen.

#### **3.2.4.4. Analyse von DNA**

##### **DNA Fällung mit Isopropanol**

Zur DNA-Präzipitation wurden ein Volumen Isopropanol zu einem Volumen DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7) gegeben. Nach kurzem Mischen und 1 Minute Wartezeit wurden die Proben 20 Minuten bei  $20.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum (SpeedVac) für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die DNA in geeignetem Volumen *ddH*<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Transfektion in Trypanosomen wurde linearisierte DNA gefällt und der Überstand nach der zweiten Zentrifugation mit Ethanol unter der Sterilbank abgenommen und die Probe dort getrocknet. Die DNA wurde dann in einer Endkonzentration von 10 µg/µl in sterilem *ddH*<sub>2</sub>O aufgenommen.

##### **Quantifizierung von DNA**

Die photometrische Quantifizierung von DNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm durchgeführt. Die OD<sub>260</sub> von 1 wurde mit 50 µg DNA/ml gleichgesetzt. Durch das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> konnten Aussagen über eventuelle Verunreinigungen der DNA gemacht werden. Das Verhältnis von 1,8 wurde als ideal angesehen.

##### **Sequenzierung von DNA**

Nach Amplifikation von DNA durch PCR oder anderen enzymatischen Manipulationen wurde die Sequenz überprüft. Die Sequenzierungen wurden von SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) oder vom Sequencing Service des Departments Biologie der LMU München durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm 4Peaks überprüft. Die korrigierte Sequenz wurde anschließend mit der theoretischen DNA-Sequenz mittels des Algorithmus Clustalw verglichen. Unterschiede zwischen den beiden Sequenzen wurden in der Plasmidkarte mit dem Programm GCK vermerkt.

## 4. Ergebnisse

Zur Untersuchung von intrazellulären Transportwegen und Sortierungsmechanismen in eukaryotischen Zellen stehen heute eine große Anzahl an gut charakterisierten Transmembranproteinen zur Verfügung. Prominent zu nennen wären hier das Glycoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat oder das Shigella-Toxin, das zur Charakterisierung von retrograden Transportwegen genutzt wird.

Für die Darstellung des Transportes von GPI-verankerten Proteinen oder des Membranflusses zwischen den Organellen einer Zelle stehen wesentlich weniger Werkzeuge zur Verfügung. Hinzu kommt, dass durch das in der Regel geringe Expressionsniveau von GPI-verankerten Proteinen in eukaryotischen Zellen wie zum Beispiel Hefe oder Säugerzellen kaum Lokalisationsstudien vorliegen, denen keine Überexpression zugrunde liegt.

*T. brucei* ermöglicht hier durch die starke Präsenz von GPI-verankerten Proteinen die Arbeit mit Expressionsniveaus, welche sehr viel näher an den physiologischen Niveaus liegen. Somit bietet dieser Organismus wesentlich bessere Bedingungen als andere Modellorganismen, um die Transportwege von GPI-verankerten Proteinen zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst GPI-verankerte Proteine gesucht, die mit GFP markiert werden konnten um diese Transportwege sichtbar zu machen. Mithilfe dieser GPI-verankerten Fusionsproteine wurden nach RNA-Interferenz die veränderten Transportwege sichtbar gemacht und so regulierende Schlüsselproteine ermittelt. Zudem benötigt die Analyse dieser GPI-verankerten Proteine in lebenden Zellen die Expression von weiteren Markerproteinen, um Colokalisationsanalysen durchführen zu können.

Eine weiterführende Fragestellung ergab sich aus dem unterschiedlichen Proteintransport in verschiedenen Lebensstadien von *T. brucei*. Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Möglichkeit zu schaffen, den Proteintransport in *short stumpy* (ss) Trypanosomen zu charakterisieren. Aufgrund der schwierigen Kultivierung sind *short stumpy* Trypanosomen bisher nur wenig charakterisiert worden.

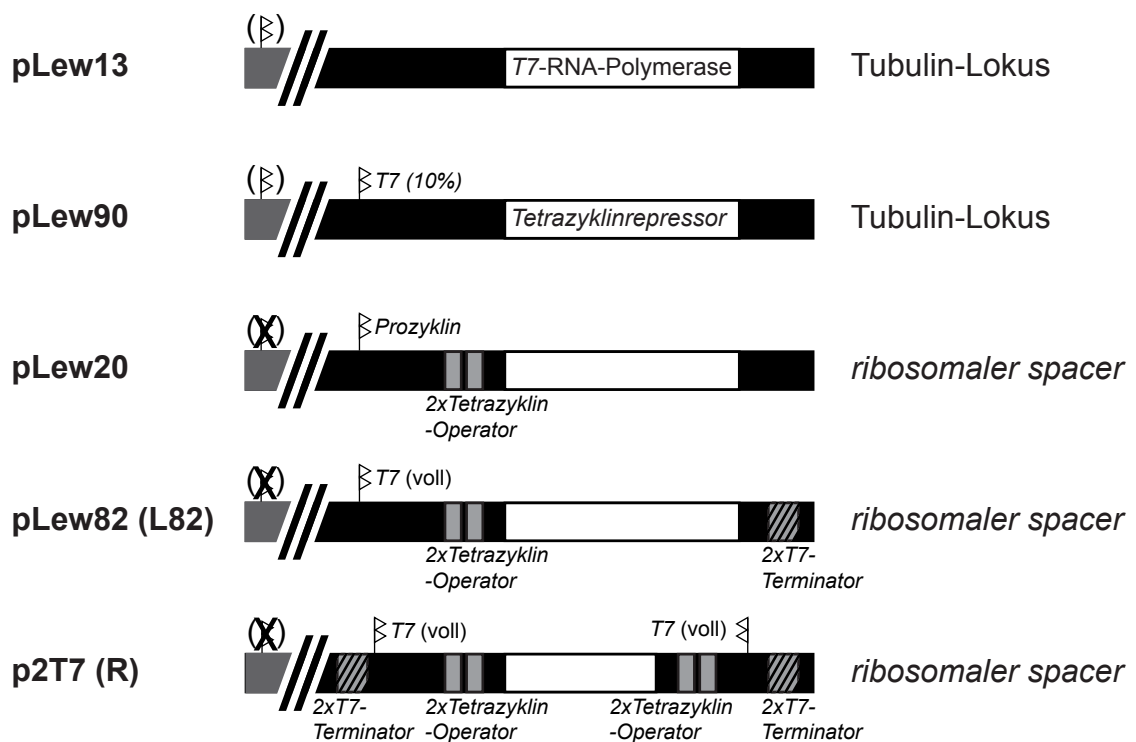
### 4.1. Herstellung und Analyse von fluoreszierenden Markerproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von GPI-verankerten, fluoreszierenden Fusionsproteinen ermöglicht, um deren Sortierung zwischen und in den Organellen zu untersuchen. Einen weiteren Schwerpunkt bildeten Proteine, die spezifisch in einzelnen Organellen lokalisierbar sind und somit als Marker für diese Organellen bei der Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen dienen können.

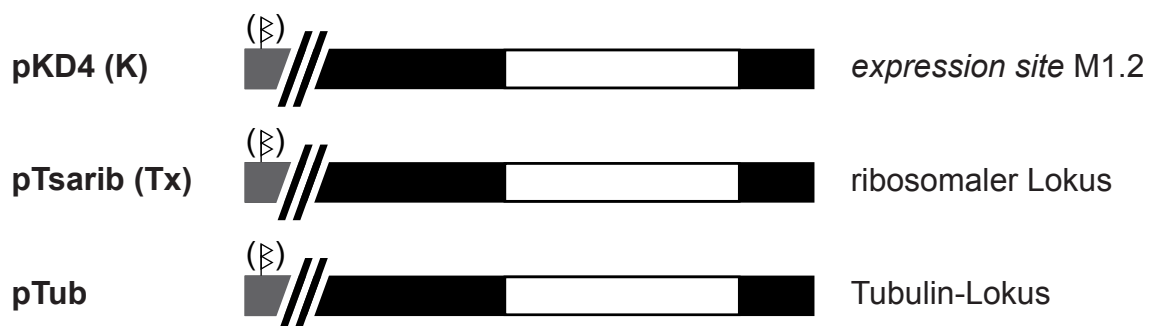
Als Ausgangszelllinie wurde *T. brucei* M1.2<sup>tet</sup> (Wirtz *et al.*, 1999) ausgewählt, um anschließende Untersuchungen mithilfe von RNA-Interferenz zu ermöglichen. Diese Zelllinie entstand durch Integration der Vektoren pLew13 und pLew90 in den Tubulin-

Lokus von M1.2 WT. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die im Rahmen dieser Arbeit zugrundeliegenden und genutzten Vektoren in Abb. 4 dargestellt. Das induzierende System dieser Zelllinie basiert auf der konstitutiven Expression des Tetrazyklinrepressors, dessen offenes Leseraster durch die vollständige 5'-UTR und die verkürzte 3'-UTR der Aldolase flankiert wird. Der Repressor bindet an den Operator und verhindert so die Anlagerung von RNA-Polymerasen an den jeweiligen Promotor. Die Bindung von Tetrazyklin bewirkt

### Vektoren des tetrazyklininduzierbaren Systems



### konstitutiv exprimierende Vektoren



**Abb. 4: Übersicht über die verwendeten Vektoren.** A) Die dem tetrazyklininduzierbaren System zugrundeliegenden Vektoren sowie die verwendeten tetrazyklininduzierbaren und konstitutiv exprimierenden Vektoren. Der Promotor über dem grauen Balken symbolisiert die Expression durch den genomischen Kontext nach Integration der Vektoren. Bei den häufigerverwendeten Vektoren ist das Vektorkürzel mit angegeben, Tx bedeutet hierbei, dass zusätzlich noch die jeweilige Resistenzkassette angegeben wird.

allerdings die Loslösung des Repressors durch allosterische Wechselwirkung, wodurch die RNA-Polymerase an den Promotor anlagern kann.

Um sowohl die Expression des Tetrazyklinrepressors als auch die der verschiedenen Zielgene zu verstärken, exprimiert die Zelllinie zusätzlich die T7-RNA-Polymerase. Durch den auf 10% Aktivität reduzierten T7-Promotor wird die Transkription des Tetrazyklinrepressors verstärkt, während die Expressionsvektoren wie bspw. pLew82 mit dem vollständigen T7-Promotor eine Überexpression ermöglichen. Die Zelllinie wurde mit 5 µg/ml Hygromycin sowie 2,5 µg/ml G418 im Kulturmedium kultiviert.

#### **4.1.1. Ein GFP-markiertes VSG zeigt eine intrazelluläre Lokalisation**

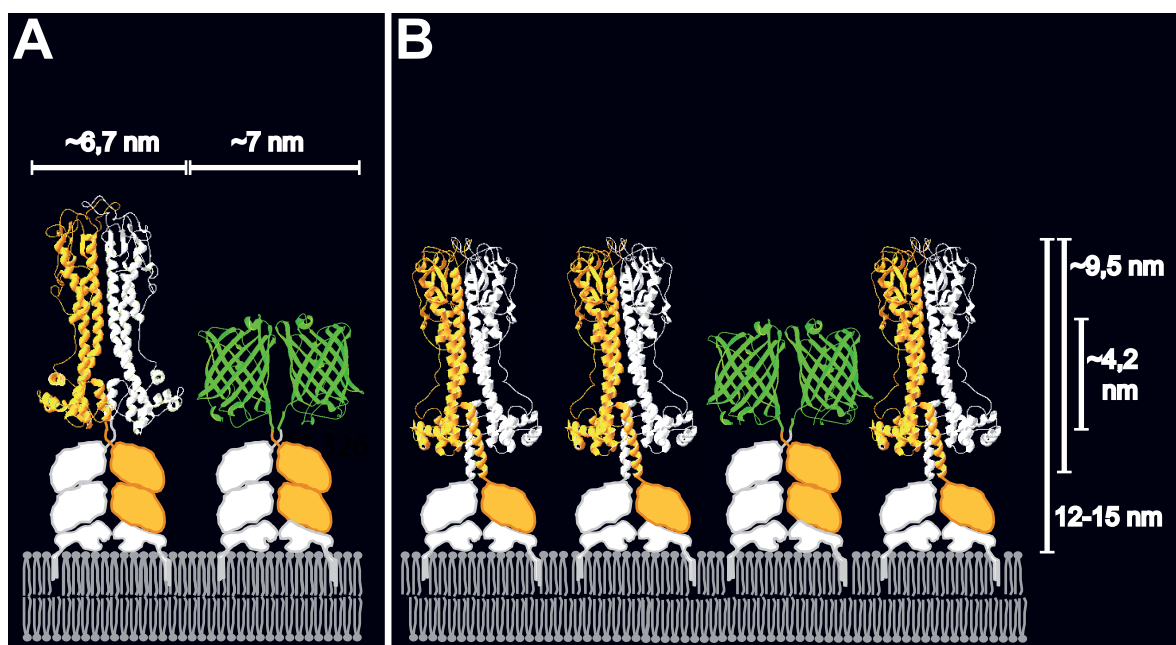
VSG ist das am stärksten exprimierte Protein in *T. brucei*. Aus diesem Grund bietet sich VSG als Markerprotein zur Untersuchung der Transportwege und Sortierungsmechanismen von GPI-verankerten Proteinen an. Da allerdings mit M1.2<sup>tet</sup> gearbeitet werden sollte und VSG221 das native VSG dieses Stammes ist, konnte nicht mit VSG221 gearbeitet werden, um zwischen dem unveränderten nativen VSG und dem zusätzlich eingebrachten Fusionsprotein klar unterscheiden zu können. VSG117 ist das native VSG der Zelllinie MITat 1.4 und weist wie VSG221 eine N-terminale Domäne des Typs A auf (Carrington *et al.*, 1991). Deshalb wurde der Entwurf des Fusionsproteins basierend auf der Tertiärstruktur von VSG221 vorgenommen. Allerdings unterscheiden sich die beiden VSGs in der Klasse der C-terminalen Domäne. Als fluoreszierende Domäne wurde GFP ausgewählt.

Nach Amplifikation des offenen Leserasters von VSG117 aufgrund der genomischen DNA von MITat 1.4 mit den Primern VSG117\_BamHI\_U1 und VSG117\_HindIII\_L1 wurde das DNA-Fragment zunächst in den Vektor pBSK II(-) ligiert. Anschließend wurde die codierende DNA der Aminosäuren 34 bis 397 durch Amplifikation des Restplasmides mit den Primern VSG117\_EheI\_U1 und VSG117\_EheI\_L1 deletiert und so das Triplet der Aminosäure 398 nach Religation zum Triplet der Aminosäure 34\*. Hierbei wurde eine *Ehe* I - Restriktionsschnittstelle mit dem Primer VSG117\_EheI\_U1 eingeführt und damit im Protein die Aminosäure K398/34\* zu A34\* mutiert. Im ligierten Endprodukt pBSK.tVSG117 bildeten so die Triplets der Aminosäuren G33 und A398/34\* die neue Restriktionsschnittstelle. In diese Restriktionsschnittstelle wurde zur Erzeugung der fluoreszierenden Domäne die codierende Sequenz von GFP eingefügt, die aus dem Vektor pEGFP mit *Xho* I und *Bsr*G I herausgeschnitten worden war. Die 5'-Überhänge des Fragmentes wurden mit dem großen Klenow-Fragment abgeschnitten. Bei den weiteren Klonierungen wird dieser Arbeitsschritt nicht jedes Mal angegeben. Im Einzelfall ist die Verwendung des Klenow-Fragmentes aus der Übersichtsgrafik Abbildung s1 der zusätzlichen Daten zu entnehmen. Nach Ligation und Überprüfung der korrekten Orientierung wurde das Fusionsgen aus dem Vektor herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pKD4 ligiert.

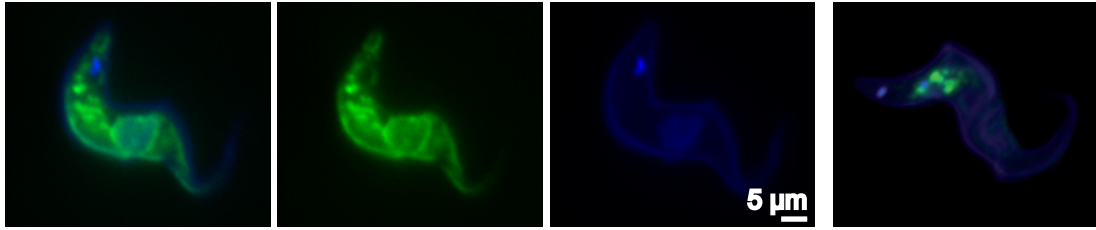


Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit, dass VSGs bezüglich der Tertiärstruktur konserviert sind (Metcalf *et al.*, 1987), wurde die Struktur der N-terminalen Domäne von VSG117 anhand der bekannten Kristallstruktur der Dmäne von VSG221 modelliert und anschließend mit den Ausmaßen von GFP verglichen (Abb. 5). Auf das Signalpeptid des VSG117 (AS 1-33) folgt das GFP (AS 38 bis AS 294 des Präproteins). Der C-Terminus des Proteins (AS 296 bis AS 423) stammt wiederum aus dem VSG117 und entspricht den nativen Aminosäuren 399 bis 526 des unprozessierten VSG117. Dieser Teil von VSG117 entspricht dem C-terminalen Teil des Proteins, welches zwei Subdomänen beinhaltet. Da die Lage der Domänen zueinander sowie die Struktur der 16 Aminosäuren zur N-terminalen Domäne hin nicht bekannt sind, wurde der Größenvergleich auf die N-terminalen Domänen beschränkt. Da die Anordnung der GFP-Monomere des VSG117:GFP vermutlich durch die Struktur der C-terminalen Domänen bestimmt wird, musste eine theoretische parallele Anordnung der GFPs angenommen werden. Eine die Integrität des VSG-Mantels störende liegende Anordnung der GFPs kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Um ein maximales Expressionsniveau zu erreichen wurde das Fragment zunächst in den Vektor pKD4 (Munoz-Jordan *et al.*, 1996) ligiert. Der Vektor pKD4 ermöglicht die Integration von Genen in die *expression site* von *T. brucei* M1.2. Die hohe Expression beruht auf der Transkription durch die DNA-Polymerase I, die in BSF die höchste Transkriptionsrate aufweist und 10% der gesamten mRNA synthetisiert (Vanhamme und Pays 1998).



**Abb. 5: Vergleich zwischen VSG221, VSG117 und dem Fusionsprotein VSG117:GFP:**  
A) Das auf Grundlage der Struktur von VSG221 modellierte VSG117 besitzt ungefähr dieselbe Breite wie ein Dimer aus von VSG117:GFP. B) Das theoretische Dimer kann in den Oberflächenmantel von VSG221 passen. Die C-terminalen Domänen von VSG117 bzw. VSG221 sind als Umriss gezeichnet. Ihr Anordnung übereinander im VSG117 dient zur Verdeutlichung.



**Abb. 6: Lokalisation des Fusionsproteins tVSG117:GFP:** tVSG117:GFP verbleibt intrazellulär vor allem im endoplasmatischen Retikulum. Blau: DAPI und  $\alpha$ -VSG221; Grün: tVSG117:GFP.

Die Transfektion von M1.2 WT mit pKD4.tVSG117:GFP (K.117G) führte in 12 Ansätzen zu insgesamt 9 Populationen, welche alle eine deutliche GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Aus diesen Populationen wurden mehrere Klone durch *limiting dilution* gewonnen.

Die Verwendung von pKD4 beinhaltet die Selektion durch das Antibiotikum G418 auf die Expression der Neomycin-Phosphotransferase. Um weitere Arbeiten mit induzierbaren Vektoren zu ermöglichen, sollte die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> mit dem linearisierten pKD4.tVSG117:GFP transfiziert werden. Diese Zelllinie ist bereits resistent gegen 12,5  $\mu$ g G418/ml, wobei gewöhnlich nur 2,5  $\mu$ g/ml G418 bei der Kultivierung eingesetzt werden.

Deshalb wurde nach der Transfektion von M1.2<sup>tet</sup> mit pKD4.tVSG117:GFP die Dosis von 50  $\mu$ g/ml G418 zur Selektion eingesetzt. Zehn unabhängige Transfektionen führten zu sechs Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>K.117G</sub>, die alle eine deutliche Fluoreszenz zeigten. Aufgrund der stärksten Expression des Fusionsproteins wurde Zelllinie #5 zur weiteren Arbeit ausgewählt. Alle sechs Zelllinien wiesen eine leicht erhöhte Verdopplungszeit von 8 h gegenüber 6 h vor der Transfektion auf.

Sowohl M1.2<sub>K.117G</sub> als auch M1.2<sup>tet</sup><sub>K.117G</sub> zeigten dieselbe Lokalisation von tVSG117:GFP in der Zelle. Wie Abbildung 6 zeigt, verteilt sich das fluoreszierende Protein unregelmäßig in der gesamten Zelle. Schon ohne Gegenfärbung erkennt man deutlich die Position des Zellkerns als Aussparung und damit die Lokalisation im ER. Weiterhin verteilt sich die Fluoreszenz sowohl im anterioren als auch im posterioren Zellbereich. Die unregelmässige Verteilung schliesst die Oberflächenlokalisierung aus, da einer Oberflächenlokalisierung die Ränder der Zelle gut zu sehen sind. Demnach ist das Fusionsprotein tVSG117:GFP nur bedingt zur Darstellung der Lokalisation des nativen VSG in *T. brucei* geeignet.

#### 4.1.2. EP1:GFP ist ein Reporter für das endosomale System

Aufgrund der starken ER-Lokalisation ist tVSG117:GFP als Markerprotein für das endoplasmatische Retikulum geeignet. Die Lokalisation des Proteins im ER ermöglicht es, Strukturveränderungen des ERs in lebenden Zellen zu beobachten. Zudem steht damit neben dem lumenalen Chaperon BiP ein membrangebundenes Markerprotein zur Verfügung. Der Ausschluss von der für VSG entscheidenden pellikularen Zelloberfläche zeigt allerdings, dass sich die Lokalisation des Fusionsproteins von der des unbeeinflussten

VSGs unterscheidet. Die starke Lokalisation des Fusionsproteins im ER erschwert zudem eine Analyse die Lokalisation in anderen Kompartimenten.

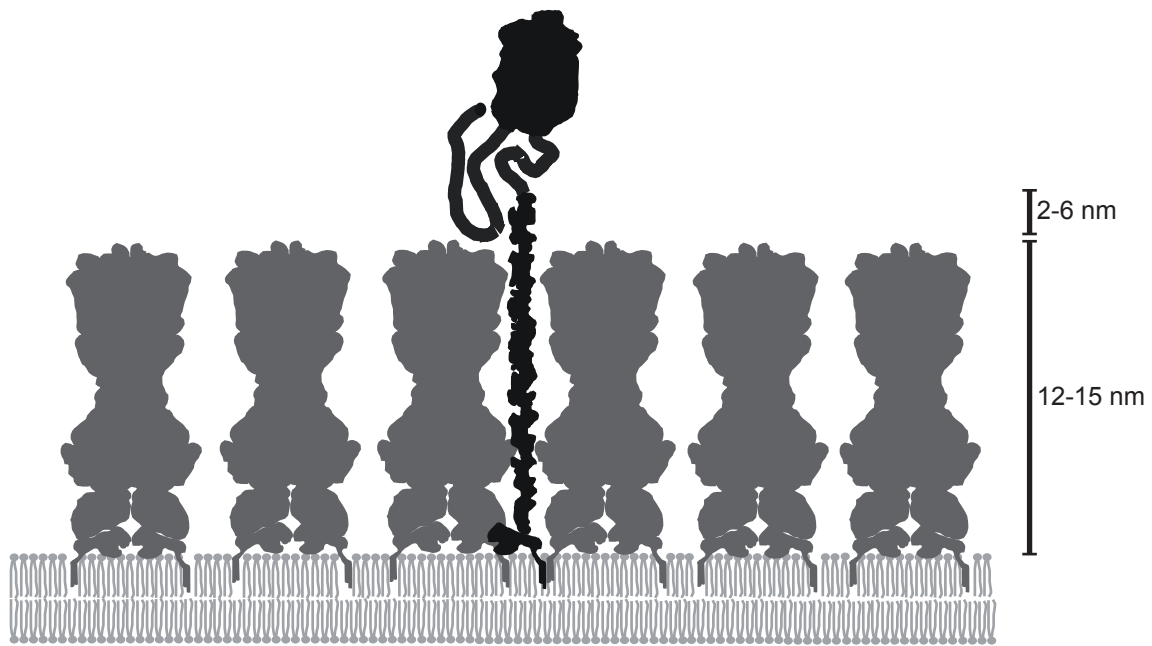
Da die Substitution der N-terminalen Domäne mit GFP zu einer veränderten Lokalisation führte, wurde nach Möglichkeiten gesucht, diese Probleme zu vermeiden. Aufgrund des Verdachtes, dass Probleme bei der Dimerisierung der ER-Retention zugrunde liegen könnten, wurde ein weiteres GPI-verankertes Protein untersucht, das als Monomer vorliegt. Die Oberflächenproteine von prozyklischen Trypanosomen boten sich hierzu als Marker an. Prozykline werden zu unterschiedlichen Zeiten während der Transformation in prozyklische Trypanosomen exprimiert (Vassella *et al.*, 2001).

Als Prozyklin-Isoform wurde EP1 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zunächst wurde *ep1* mittels PCR unter Verwendung von genomischer DNA aus M1.2 amplifiziert. Durch die Primer eingefügte *EcoR* I-Schnittstellen ermöglichten die Ligation in den Vektor pBSK. Das durch *Sma* I und *BsrG* I aus dem Originalvektor pEGFP (Clontech) ausgeschnittene offene Leseraster von GFP wurde in die native *Ehe* I-Schnittstelle des EP1-Gens eingefügt. Das Genfragment *ep1:gfp* wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Hae* II und *EcoR* V aus dem Vektor pBSK herausgeschnitten und anschließend mit den Vektoren pKD4 und pTSArb(hyg) ligiert.

In dem resultierenden Fusionsprotein befindet sich die GFP-Domäne zwischen den Aminosäuren 24 und 25 des nativen Prozyklins und demnach in der Region oberhalb der EP-Wiederholungen des EP1 (bis AS 52). Es ist postuliert worden, dass die Glu-Pro-Wiederholungen von EP-Prozyklinen eine langgestreckte Form bilden, die mit 14-18 nm Länge über den ca. 10 nm dicken VSG-Mantel hinausragt und so die Lokalisation von Prozyklinen zwischen den VSGs von differenzierenden Trypanosomen ermöglicht (Roditi *et al.*, 1989). Durch die Positionierung des GFPs in die N-terminale Domäne oberhalb der Glu-Pro-Wiederholungen ist bei Ausbildung des EP-Stammes das GFP außerhalb des VSG-Mantels positioniert und würde somit die dichte Anordnung der VSGs auf der Oberfläche nicht stören (Abb. 7).

Das Konstrukt pKD4.EP1.GFP (K.EG) wurde in die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> transfiziert und die Zellen mit 5 µg/ml Hygromycin und 50 µg/ml G418 selektiert. Von zehn Transfektionen führten insgesamt fünf zu Zelllinien, die gegen 50 µg/ml G418 resistent waren. Zwei der Zelllinien wiesen eine Fluoreszenz auf, deren Stärke in den einzelnen Zellen differierte. Deshalb wurden eine der Zelllinien durch *limiting dilution* auskloniert. Die resultierenden vier klonalen Zelllinien hatten jedoch nur ein sehr niedriges Expressionsniveau von GFP auf.

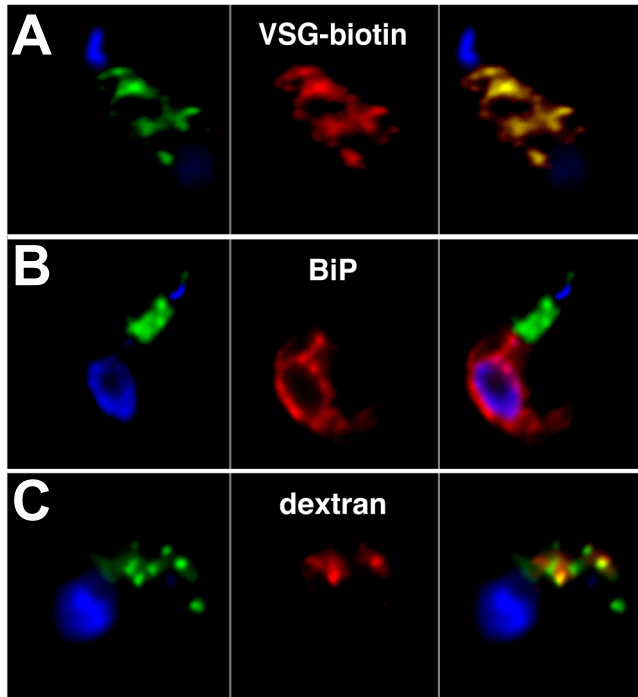
Eine weitere rekombinante Zelllinie konnten erst 19 Tage nach Transfektion untersucht werden. Sie zeigte ein weitaus einheitlicheres Expressionsniveau des Fusionsproteins zwischen den einzelnen Zellen. Sowohl die hohe Verdopplungszeit von 10 h sowie die lange Erholungszeit der Kultur nach der Transfektion zeigten die geringe Fitness der Zellen



**Abb. 7:** Darstellung der vermuteten Anordnung von EP1 im VSG-Mantel von Blutstromformen. Die EP-Wiederholungen in Prozykin bilden vermutlich einen schmalen Stamm mit 0,9 nm Durchmesser und 14-18 nm Höhe aus. Dies würde die Einordnung in den VSG-Mantel ermöglichen (modifiziert nach Roditi *et al.*, 1989).

befürchten. Da die Passage durch einen Säugetierwirt die Fitness einer *T. brucei*-Population verbessern kann, wurde diese Zelllinie in einen Nager injiziert und vier Tage später nach Tötung der Tiere wieder *in vitro* kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Zellen eine einheitliche und hohe Expression von GFP auf. Die Verdopplungszeit der resultierenden Zelllinie betrug 8 h und ist somit ein wenig niedriger als die Verdopplungszeit der Zelllinie vor der Passage durch Nager.

EP1:GFP wies eine vorwiegende endosomale Lokalisation auf. Abbildung 8 zeigt EP1:GFP mit verschiedenen Gegenfärbungen durch Antikörper. EP1:GFP kann im posterioren Teil der Zelle zwischen Kinetoplast und Nukleus lokalisiert werden. Im Gegensatz zu der Lokalisation von tVSG117:GFP zeigte es jedoch nicht die Charakteristika einer ER-Lokalisation, da im anterioren Teil der Zelle keine Fluoreszenz nachweisbar war. Dies legt den Schluss nahe, dass sich EP1:GFP im endosomalen System mit allen endosomalen Subkompartimenten befindet. Während endozytiertes VSG und Dextran beide in einem hohen Maß mit EP1:GFP colokalisiert sind, konnte durch die Gegenfärbung des ER-Proteins BiP gezeigt werden, dass keine nennenswerte ER-Lokalisation von EP1:GFP vorliegt (Abb. 8). Die hohe Übereinstimmung der Lokalisationen von EP1:GFP und endozytiertem VSG machen EP1:GFP zu einem geeigneten Protein, um die Transportwege von VSG näher zu charakterisieren.

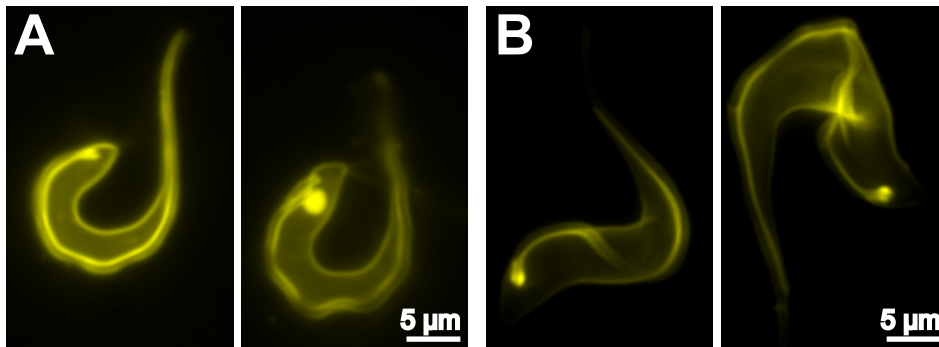


**Abb. 8: Lokalisation von EP1:GFP in *T. brucei*.** A) EP1:GFP ist mit endozytiertem VSG colokalisiert. B) EP1:GFP ist im ER nicht nachweisbar C) Endozytierte lumenale Facht ist nur zum Teil mit EP1:GFP colokalisiert. EP1:GFP (grün), biotinyliertes VSG (A), BiP (B) und Dextran (C) (rot), DAPI (blau) (modifiziert nach Engstler *et al.*, 2004).

#### 4.1.3. VSG'Y' markiert die Zelloberfläche von lebenden Trypanosomen

Die Transfektionen von M1.2 WT mit pKD4.EP1:GFP führte zu mehreren klonalen Zelllinien. Bei der Untersuchung eines der Klone stellte sich heraus, dass die Zellen eine starke Fluoreszenz einer Emissionswellenlänge von 530 nm aufweisen. Allerdings war die Anregungswellenlänge nicht die von GFP (488 nm), sondern wesentlich kurzwelliger bei etwa 390 nm. Die Fluoreszenz zeigte sich ausschließlich auf der Oberfläche der Zellen inklusive der Flagellartasche (Abb. 9).

Aufgrund der Oberflächenlokalisierung lag der Verdacht nahe, dass es sich bei dem unbekannten Protein um ein VSG handeln könnte. Um dies zu überprüfen wurde eine Immunofluoreszenz mit einem Antikörper gegen das ursprüngliche VSG221 durchgeführt. Allerdings konnte VSG221 in diesen Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Demnach hatte die Zelllinie das exprimierte VSG gewechselt und gleichzeitig angefangen, ein fluoreszierendes Oberflächenprotein zu exprimieren. Da die Zelllinie gegen das Antibiotikum G418 resistent war und somit die *expression site* des VSG221 nach wie vor aktiv sein musste, war es wahrscheinlich, dass ein anderes VSG von der VSG221-*expression site* exprimiert wird. Da das VSG eine Emission mit einer Wellenlänge von etwa 530 nm aufweist wurde es VSG'yellow' (VSG'Y' bzw. VY) genannt.



**Abb. 9:** Die Fluoreszenz der Zelllinie  $MVY_{K.EG} \#2a-21$  beruht auf der Expression eines anderen VSGs. A) Fluoreszenz von  $MVY_{K.EG} \#2a-21$  bei einer Exzitation von 390 nm; B)  $M1.2_{K.VY}$  bei der Exzitation von 390 nm.

Da VSG'Y' ein möglicher Reporter zur Analyse von Traffickingwegen ist, wurde das Gen *vsg'y'* kloniert. Das VSG lag zunächst nur als Oberflächenprotein der Zelllinie  $M.VY_{K.EG} \#2a-21$  vor. Deshalb wurde aus der Zelllinie zunächst mRNA isoliert. Anschließend wurde durch reverse Transkription die cDNA der VSG'Y'-mRNA hergestellt und nachfolgend über PCR mit den Primern VSGY\_MluI\_U1 und VSGY\_MluI\_L1 amplifiziert. Diese Primer basieren auf der Sequenz des Miniexons (VSGY\_MluI\_U1) sowie des bei VSG-mRNAs konservierten 14mers (VSGY\_MluI\_L1). Das entstandene PCR-Produkt wurde in den Vektor pKD4 ligiert und ergab den Vektor pKD4.VSG'Y'. Um die Sequenz zu ermitteln wurde VSG'Y' in pBSK mit den Schnittstellen *Hind* III und *Bam*H I gebracht.

Durch Transfektion von pKD4.VSG'Y' ( $K.VY$ ) in  $M1.2$  WT wurde überprüft, ob die Fluoreszenz der Zelllinie  $MVY_{K.EG} \#2a-21$  auf dem klonierten VSG beruhte. Von fünf Transfektionen führten drei nach Selektion mit 10 µg/ml G418 zu resistenten Zelllinien. Diese Zelllinien wiesen eine Verdopplungszeit von 7 bis 10 h auf. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Abbildung 9b zeigt die Fluoreszenz lebender Zellen dieser Transfektion. Wie in der Zelllinie  $MVY_{K.EG} \#2a-21$  exprimierte  $M1.2_{K.VY}$  ein fluoreszierendes Protein auf der Zelloberfläche und in der Flagellartasche und bewies damit, dass VSG'Y' wirklich das unbekannte fluoreszierende Protein war.

Um das fluoreszierende VSG'Y' auch für RNA-Interferenz-Experimente nutzen zu können, wurde pKD4.VSG'Y' in die Zelllinie  $M1.2^{tet}$  transfiziert. Um die Selektion auf ein höheres Expressionsniveau der Neomycin-Phosphotransferase zu ermöglichen wurde dieselbe Strategie wie unter 4.1.1 gewählt.

Insgesamt fünf unabhängige Transfektionen führte zu vier Populationen  $M1.2_{K.VY}^{tet}$ , welche alle VSG'Y' exprimierten. Ähnlich wie die Zelllinien  $M1.2_{K.VY}$  wiesen auch diese Zelllinien eine erhöhte Verdopplungszeit von etwa 8 h auf.

Durch die Klonierung und Expression von VSG'Y' wurde ein Markerprotein gefunden, welches durch seine außergewöhnlichen Fluoreszenzeigenschaften als *life cell marker* eingesetzt werden kann.



#### 4.1.3.1. Insertion und Expression des VSG'Y' -Gens in einem anderen genomischen Kontext

Durch die ausschließliche Integrierbarkeit des linearisierten Vektors pKD4 in die *expression site* von VSG221 ist der Vektor pKD4 auf das Serodem MITat1.2 beschränkt. Um VSG'Y' und andere fluoreszenzmarkierte Proteine auch in Zelllinien mit anderer aktiver *expression site* einsetzen zu können, wurde der Vektor pTSArb (Xong *et al.*, 1998) ausgewählt. Dieser Vektor ermöglicht die Rekombination in die Region des ribosomalen Promotors und eine konstitutive Expression in allen Trypanosomenstämmen unabhängig vom Lebensstadium. Zur Abgrenzung von weiteren Varianten des Vektor, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, wird pTSArb im Folgenden als pTSArb(hyg) bezeichnet, da er durch die Expression der Hygromycin Phosphotransferase die Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin vermittelt. pTSArb(hyg) wurde mit *Hind* III und *Bam*H I geschnitten und das offene Leseraster des VSG'Y' eingefügt.

Mit dem linearisierten Plasmid pTSArb(hyg).VSG'Y' (Th.VY) wurde die Zelllinie M1.2<sub>K.EG</sub> transfiziert. Von sechs Transfektionen führten drei zu überlebenden Zelllinien. Alle drei Populationen wiesen eine deutliche Expression von VSG'Y' auf. Die Expressionsniveaus wurden durch Quantifizierung der Fluoreszenz miteinander verglichen. Der Vektor pTSArb(hyg).VSG'Y' erlaubt die Expression von VSG'Y' in einer Höhe von etwa 25,8% +/- 5,4% der Expressionsniveaus des pKD4 (n=180). Dieses im Vergleich zur *expression site* niedrigere Expressionsniveau erlaubt dennoch eine gute Detektion von VSG'Y'.

#### 4.1.3.2. M1.2<sub>K.117G</sub><sup>tet</sup> ist induzierbar und ein zusätzliches VSG erreicht die pellikulare Zelloberfläche

Die Zelllinien M1.2<sub>K.117G</sub><sup>tet</sup> ist durch die Transfektion mit linearisiertem pKD4 gegen 50 µg G418 resistent. Die Zelllinie war allerdings bereits vor der Transfektion gegen 12,5 µg/ml G418 resistent. Diese Resistenz gewährleistete die Expression der T7-Polymerase aufgrund des pLew13. Durch die Insertion des pKD4 in die *expression site* wird das Expressionsniveau der Neomycin-Phosphotransferase deutlich erhöht, so dass die bereits stattfindende geringere Expression aufgrund des pLew13 nicht mehr überlebensnotwendig für die Zellen ist. Um auszuschliessen, dass die Expression der T7-Polymerase ohne direkten Selektionsdruck verändert wird, wurden die Zellen mit dem Vektor pLew82.VSG'Y' transfiziert und nach Induktion die Expression des durch die T7-Polymerase exprimierten VSG'Y's überprüft. pLew82 integriert in den ribosomalen *spacer* von *T. brucei* und beinhaltet einen T7-Promotor und zwei Tetrazyklin-Operatoren. Durch den Promotor wird nicht nur die Expression des jeweils gewünschten Genes angetrieben, sondern auch die Expression des Phleomycin-bindenden Proteins. Aus diesem Grund muss unter Zugabe von 1 µg/ml Tetrazyklin selektiert werden. Die Resistenz gegen Phleomycin ist direkt stöchiometrisch an die Expression durch die T7-Polymerase gebunden und ist ebenso wie die Expression des durch pLew82



inserierten Genes ein Beweis für die Expression der T7-Polymerase. Um die Expression durch die T7-Polymerase einfach und schnell feststellen und messen zu können, wurde das Gen für VSG'Y' verwendet.

Aus dem vorliegenden Vektor pKD4.VSG'Y' wurde die codierende Sequenz für VSG'Y' mit den Enzymen *Hind* III und *Bam*H I ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Hind* III und *Bam*H I geschnittenen Vektor pLew82 ligiert. Die korrekte Insertion wurde durch Restriktionsverdaus überprüft.

Die Transfektion von M1.2<sup>tet</sup><sub>K.117G</sub> mit pLew82.VSG'Y' (L82.VY) ergab bei fünf Transfektionen zwei Zellpopulationen M1.2<sup>tet</sup><sub>K.117G</sub><sup>L82.VY</sup>. Beide Zelllinien wiesen eine starke Fluoreszenz durch VSG'Y' auf. Diese starke Fluoreszenz und die Resistenz der Zellen beweist die Expression der T7-Polymerase.

Die Expression durch pLew82 ermöglicht auch, die Funktionalität des Tetrazyklinrepressors zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde das Tetrazyklin aus den Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen ohne Phleomycin und ohne Tetrazyklin 24 h lang inkubiert. Beide Zelllinien zeigten nach der Entfernung des Tetrazyklins keine Expression von VSG'Y'. Diese Herunterregulation der Expression von VSG'Y' zeigt die Funktionalität des tetrazyklininduzierbaren Systems in den Zellen M1.2<sup>tet</sup><sub>K.117G</sub><sup>L82.VY</sup>.

#### 4.1.4. Konstitutive Koexpression zweier Markerproteine in einer Zelllinie

Da die *expression site* des VSG221 nur einmal im Genom vorliegt ist es allein mit dem Vektor pKD4 nicht möglich, weitere fluoreszierende Markerproteine in den hergestellten Zelllinien zu exprimieren. UM eine weitere Manipulation der *expression site* zu vermeiden, wurde als weiterer Expressionsvektor pTSArb(hyg) verwendet, der durch die Integration in den ribosomalen Promotor die höchste konstitutive Expression unabhängig vom Lebensstadium ermöglicht. Die Transfektion der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> mit pTSArb erfordert den Austausch des resistenzvermittelnden Gens.

Im Rahmen anderer Experimentalreihen wurde der Vektor pGaprone(ble).VSG'Y' hergestellt, indem die Gen-Kassette von VSG'Y' (siehe Kapitel 4.1.2) in den Vektor pGaprone(ble) ligiert wurde. In diesem Vektor wurde das Gen des Phleomycin-bindenden Proteins und beide UTRs mit den Enzymen *Xba* I und *Stu* I ausgeschnitten. Die DNA-Enden wurden mit dem großen Klenow-Fragment aufgefüllt. Aus dem Vektor pHD887 (C. Clayton) wurde das Cytidin-Deaminasegen, welches die Resistenz gegen das Antibiotikum Blastidicin vermittelt, mit den Enzymen *Sma* I und *Stu* I herausgeschnitten und in den pGaprone.VSG'Y' ligiert. Der entstandene Vektor wurde pGaprone(blas).VSG'Y' (Gb.VY) genannt. Aus diesem Vektor wurde der gesamte Bereich von der verkürzten 5'-UTR von VSG'Y' bis zum Ende der 3'-UTR des Cytidin Deaminase Gens mit den Enzymen *Hind* III und *Stu* I herausgeschnitten. Als Vektor wurde das 4,5 kb DNA-Fragment aus dem Verdau von pTSArb(hyg) mit *Hind* III

und *Ehe I* verwendet. Die Ligation beider Fragmente führte zu dem Plasmid pTSAr**ib**(blas).VSG'Y' (Tb.VY).

Zehn unabhängigen Transfektionen von pTSAr**ib**(blas).VSG'Y' in die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>Tb.VY</sub> ergaben neun resistente Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>Tb.VY</sub>. Nach Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich heraus, dass acht von diesen Zelllinien eine eindeutige Fluoreszenz und damit VSG'Y'-Expression aufwiesen. Von diesen Zelllinien wurde #7 ausgewählt, da das Expressionsniveau von VSG'Y' am höchsten war bei geringer Varianz zwischen den Zellen.

Anschließend wurde die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG</sub> mit dem Vektor transfiziert, um eine induzierbare Zelllinie herzustellen, die sowohl VSG'Y' als auch EP1:GFP konstitutiv exprimiert. Zehn Transfektionen führten zu zwei resistenten Zelllinien. Die resultierende Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG Tb.VY</sub> #6 wies das höhere Expressionsniveau auf. Allerdings variierte das Expressionsniveau stark zwischen den einzelnen Zellen, so daß aus der Population mittels *limiting dilution* mehrere klonale Zelllinien vereinzelt wurden. Von den insgesamt 9 erhaltenen klonalen Zelllinien wurde M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG Tb.VY</sub> #6-1 wegen des hohen Expressionsniveaus von VSG'Y' ausgewählt und für weitere Experimente genutzt.

Da der Vektor in späteren Experimenten ohne dauernde Selektion eingesetzt werden sollte, wurde die Stabilität der Expression ohne Selektionsdruck durch Gesamtzellextrakte überprüft. Hierzu wurden die Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>Tb.VY</sub> und M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG Tb.VY</sub> 48 h und 96 h mit und ohne Blasticidin kultiviert und anschließend Gesamtproteinextrakt hergestellt. Abbildung 10 zeigt die quantitative Auswertung des Blots sowie die relative Expressionsstärke von VSG'Y' nach Abgleich der Proben anhand der Intensität der PFR-Banden. Nach 48 h Inkubation ohne Blasticidin zeigte die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG Tb.VY</sub> ein um 8% höheres Expressionsniveau von VSG'Y' als die Vergleichskultur mit Blasticidin. Nach 96 h unterschieden sich die Expressionsniveaus nur minimal um 0,7%. Bemerkenswert ist die hohe Schwankung der Intensitäten und insbesondere der Anstieg nach 96 H Inkubation. Bei der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>Tb.VY</sub> verringerte sich die Expression von VSG'Y' unter Selektionsdruck von 100% auf 76%, während die Expression ohne Selektionsdruck im gleichen Zeitraum von 101% auf 109% anstieg. Bemerkenswert ist hierbei der große Unterschied zwischen der Kultur mit und der Kultur ohne Antibiotikum. Die maximale Differenz von 24% zeigte sich allerdings unter Selektionsdruck, während die Expressionsniveaus ohne Selektionsdruck sogar noch anstiegen.

Die Messung der Menge an VSG'Y' durch die Fluoreszenzstärke bezogen auf einzelne Zellen (Kap. 4.1.3.1) ergab eine Standardabweichung von etwa 21%. Die Abnahme des Expressionsniveaus lag durchschnittlich durchaus im Rahmen der Varianz innerhalb des Klonen. Da allerdings ein Expressionsniveau von 20% der *expression site* für einen Nachweis der Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie ausreicht, konnte der Vektor pTSAr**ib**(blas) für die Expression von Markerproteinen in Trypanosomen eingesetzt werden.

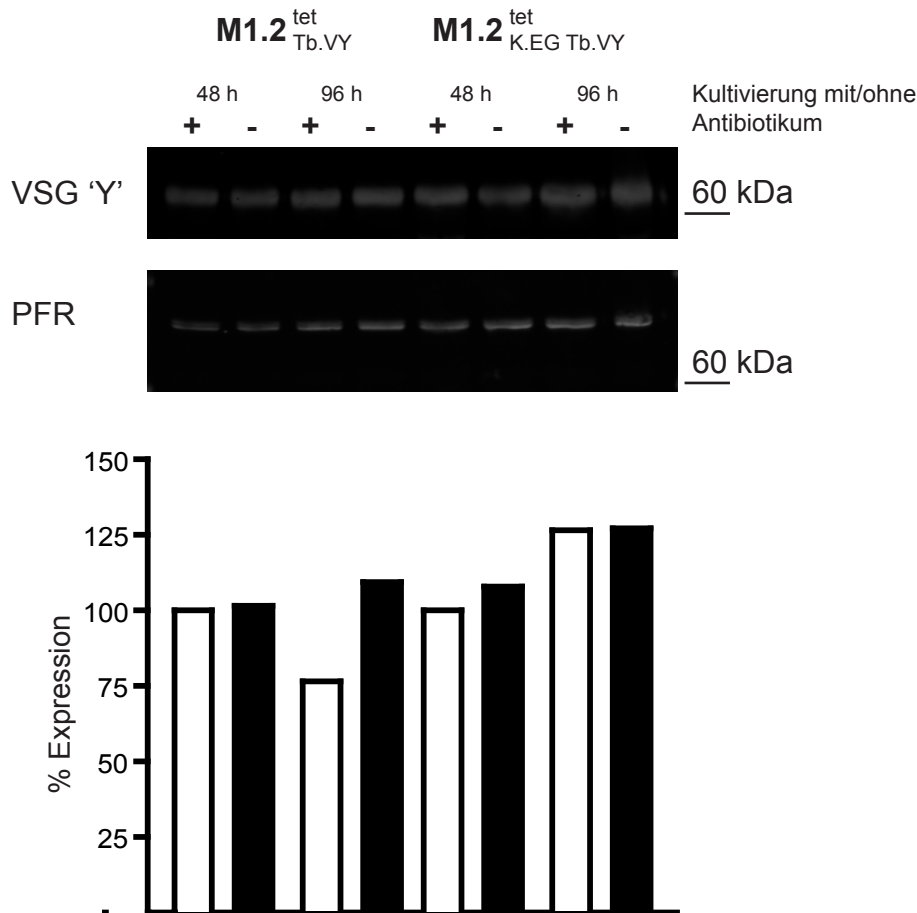
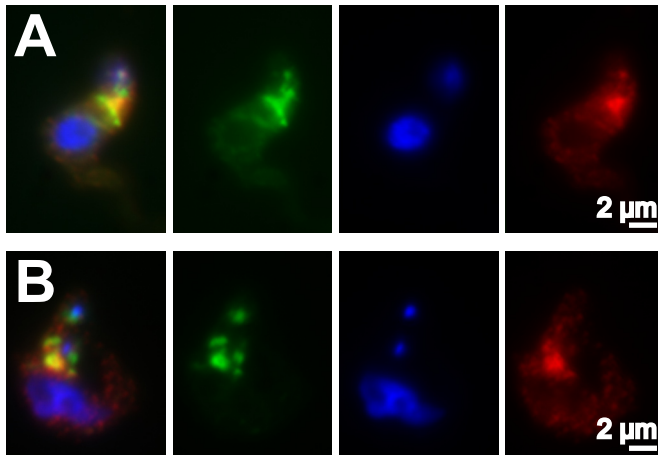


Abb. 10: Die Expression von VSG'Y' im ribosomalen Lokus ist nicht von der Anwesenheit des Antibiotikums abhängig. Die Expressionsniveaus von VSG'Y' aus dem ribosomalen Lokus wurden 48 h bzw. 96 h nach Kultivierung unter Selektionsdruck und ohne Selektionsdruck durch Western Blot ermittelt und anhand des Proteins PFR abgeglichen. Die unterschiedlichen Expressionsniveaus korrelieren nicht mit der Anwesenheit des Antibiotikums.

#### 4.1.4.1. Expression von EP1:YFP im ribosomalen Lokus

Um die Expression von EP1-Fusionsproteinen im ribosomalen Lokus anderer Zelllinien als M1.2<sup>tet</sup> zu ermöglichen, wurde ein weiterer Vektor hergestellt. Im Rahmen anderer Arbeiten war bereits das Fusionsgen *ep1:bfp* verwendet worden. Der Aufbau dieses Fusionsgens entspricht dem von *ep1:gfp*. Dieses Gen wurde in den Vektor pGaprone(ble), der mit den Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *EcoR* V behandelt wurde, ligiert. In dem resultierenden Vektor pGaprone(ble).EP1:BFP wurde das offene Leseraster für BFP gegen das für GFP ausgetauscht, indem *bfp* mit *Ehe* I entfernt wurde und das ebenso geschnittene PCR-Produkt (Primer EP1\_EheI\_U1 und EP1\_EheI\_L1) mit dem Leseraster von *yfp* eingefügt wurde. Aus dem entstandenen Vektor pGaprone(ble).EP1:YFP wurde das Gen Fragment mit dem offenen Leseraster des Fusionsproteins unter Ausnutzung der Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Hind* III hergestellt und in den durch *Bam*H I und *Hind* III linearisierten Vektor pTSArif(blas) ligiert.



**Abb. 11: Expression von EP1:YFP im ribosomalen Lokus.** A-B) EP1:YFP ist zum größten Teil im endosomalen Kompartiment lokalisiert. Das Expressionsniveau des ribosomalen Lokus ermöglicht eine Lokalisationsanalyse. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: (A) *TbMBAP* (endosomales Kompartiment), (B) *TbRab7* (späte Endosomen), Grün: EP1:YFP.

Aufgrund des vorher gezeigten niedrigeren Expressionsniveaus des pTSAr**ib** verglichen mit der *expression site* musste überprüft werden, ob auch das Expressionsniveau von EP1:YFP für eine Colokalisationsanalyse ausreicht. Die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> wurde mit pTSAr**ib**(blas).EP1:YFP (Tb.EY) transfiziert und zeigte eine erkennbare YFP-Fluoreszenz. Durch Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von EP1:YFP im endosomalen Kompartiment bestätigt. Abbildung 11 zeigt, dass EP1:YFP zum größten Teil mit der sauren Phosphatase *TbMBAP* (Engstler *et al.*, 2005a) colokalisiert ist. Auch die Lokalisation von EP1:YFP in späten Endosomen konnte durch Gegenfärbung mit  $\alpha$ -*TbRab7* gezeigt werden. Trotz des niedrigeren Expressionsniveaus ist M1.2<sub>Tb.EY</sub> zur Lokalisationsanalyse geeignet.

#### 4.1.4.2. Expression von tVSG117:GFP außerhalb der *expression site*

Der Vektor pKD4 beschränkt den Einsatz von tVSG117:GFP auf MITat 1.2. Da das Fusionsprotein ein wertvoller Reporter zur Untersuchung des ER-Exports von GPI-verankerten Proteinen sein könnte und andere Stämme von *T. brucei* geeigneter sind, die Untersuchungen in unterschiedlichen Lebensstadien durchzuführen, wurde das offene Leseraster des Fusionsproteins in die konstitutiven Expressionsvektoren pTSAr**ib**(hyg) und pTSAr**ib**(blas) ligiert. Das Gen-Fragment wurde mit *Spe* I und *Cla* I aus dem Vektor pBSK.tVSG117:GFP ausgeschnitten und mit dem mit *Hind* III linearisierten pTSAr**ib**(hyg) ligiert. Aus diesem Plasmid pTSAr**ib**(hyg).tVSG117:GFP wurde das Gen-Fragment mit den Enzymen *Dra* I und *Sph* I herausgeschnitten und anschließend mit dem *Bam*H I und *Sph* I geschnittenen Vektor pTSAr**ib**(blas) ligiert. Die beiden resultierenden Plasmide wurden pTSAr**ib**(hyg).tVSG117:GFP (Th.117G) und pTSAr**ib**(blas).tVSG117:GFP (Tb.117G) genannt. Zur Linearisierung wurde *Sph* I genutzt. Nach fünf unabhängigen Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> mit pTSAr**ib**(blas).tVSG117:GFP wurden drei Zelllinien erhalten. Zwei dieser Zelllinien

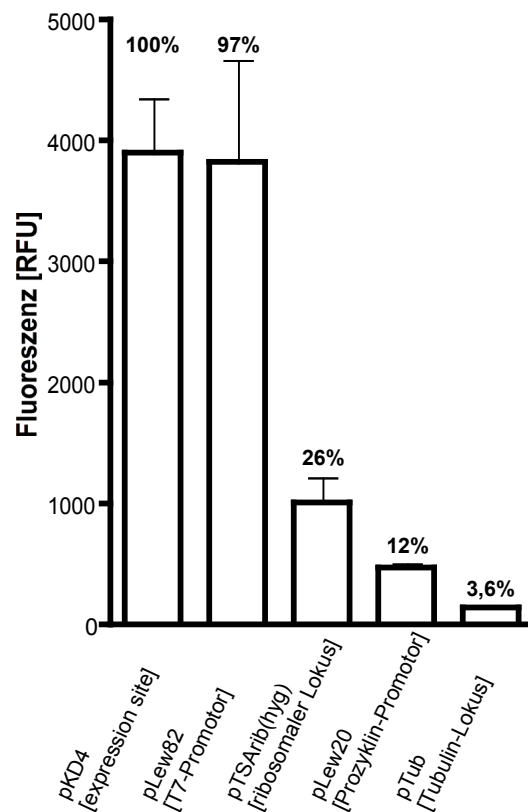
wiesen allerdings eine sehr hohe Verdopplungszeit auf. Die dritte Zelllinie (#4) wies nur eine leicht erhöhte Verdopplungszeit von etwa 8h auf und zeigte eine gut detektierbare Expression von tVSG117:GFP.

#### **4.1.4.3. VSG'Y' gelangt auch in niedrigen Konzentrationen auf die Zelloberfläche**

In BSF ist fast ausschließlich VSG auf der pellikularen Zelloberfläche nachweisbar. Eine extreme Überexpression des Transferrinrezeptors führt dazu, dass sich der Rezeptor nicht mehr nur noch in der Flagellartasche befindet, sondern auch auf der restlichen Zelloberfläche (Mussmann *et al.*, 2003). Um den Einfluss des Expressionsniveaus auf die Lokalisation von VSG'Y' auf der pellikularen Zelloberfläche zu untersuchen, wurden Vektoren hergestellt, die die Expression von *vsg'y'* unter der Kontrolle von schwachen Promotoren ermöglichen. Die beiden ausgewählten Vektoren waren pLew20 (Wirtz *et al.*, 1998) und pHD328 (Wirtz *et al.*, 1994). Der Vektor pHD328 ermöglicht die Integration in den Tubulin-Lokus und wurde deshalb in pTub umbenannt, um eine einheitliche Nomenklatur einzuhalten. Das Transkriptionsniveau hängt alleine vom genomischen Kontext ab. Der Vektor pLew20 ermöglicht nach Integration in den *ribosomal spacer* die Expression durch den Prozyklin-Promotor, der mit einem Tetrazyklin-Operator versehen worden war. In BSF ermöglicht der Prozyklinpromotor eine Expression auf niedrigem Niveau (Pays *et al.*, 1994). pLew20.VSG'Y' wurde einfach durch Austausch des offenen Leserahmens des Luciferase-Gens gegen *vsg'y'* mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*H I hergestellt und diente zugleich als Grundlage für pTub.VSG'Y'. Der offene Leserahmen von pHD328 wurde durch Linearisieren mit den Enzymen *Bsa*B I und *Sph* I gegen ein entsprechendes Fragment aus dem Vektor pLew20.VSG'Y' ausgetauscht.

Um gleichzeitig beobachten zu können, ob EP1:GFP ebenfalls von der pellikularen Zelloberfläche ausgeschlossen blieb, wurde die Zelllinie M1.2<sub>K.EG</sub> zur Transfektion mit pLew20.VSG'Y' (L20.VY) ausgewählt. Zur Transfektion war der Vektor mit *Sph* I linearisiert worden. Nach Transfektion wurde mit 2 µg/ml Phleomycin selektiert. Tetrazyklin war nicht notwendig, da die Zelllinie M1.2<sub>K.EG</sub> keinen Tetrazyklinrepressor exprimiert. Alle transfizierten Populationen wiesen die Fluoreszenz von VSG'Y' auf.

Der Vektor pTub.VSG'Y' wurde nach Linearisieren mit *Not* I in die Zelllinie M1.2 WT transfiziert. Alle der Transfektionen ergaben nach Selektion mit 2 µg/ml Phleomycin Zelllinien, welche eine sehr schwache Fluoreszenz aufwiesen. Durch Fluoreszenzmikroskopie wurden die Expressionsniveaus der Zellen ermittelt und bezogen auf M1.2<sub>K.VY</sub> und M1.2<sub>Th.VY</sub> anhand der Expression durch pKD4 abgeglichen. pLew20.VSG'Y' ermöglichte eine Expression von etwa 12% verglichen mit pKD4. Auch die niedrigste Expression durch pTub mit <5% Expressionsniveau erlaubte VSG'Y' den Zugang zur pellikularen Zelloberfläche. Abbildung 12



**Abb. 12: Expressionsniveaus von VSG'Y' durch unterschiedliche Promotoren.** Das Expressionsniveau von VSG'Y' wurde durch Messung der relativen Fluoreszenzeinheiten gemessen.

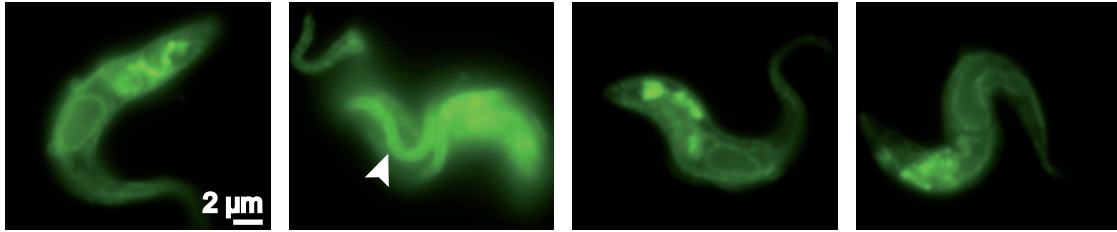
zeigt die unterschiedlichen Expressionsniveaus der unterschiedlichen Zelllinien, welche VSG'Y' exprimieren.

#### 4.1.4.4. Überexpression verschiedener GPI-verankerter Proteine

Die erzeugten Zelllinien wiesen alle durch die zusätzliche Expression erhöhten Anteil von GPI-verankerten Proteinen auf. Um die Auswirkung der erhöhten Menge GPI-verankerter Proteine zu untersuchen, wurde die Expression durch Kombination mehrerer weiterer Vektoren weiter erhöht.

Da zu diesem Zeitpunkt die Varianten des pTSArb noch nicht vorlagen wurde auf andere Expressionsvektoren zurückgegriffen. Als Expressionsvektoren wurden aufgrund ihrer hohen Expressionsniveaus die Vektoren pTSArb(hyg), pLew20 und pKD4 ausgewählt. Die Verwendung unterschiedlicher GPI-verankerter Reportermoleküle ermöglichte eine einfache Bestätigung der Rekombinationen.

Als Zelllinie wurde M1.2<sup>L20.VY</sup><sub>K.EG</sub> ausgewählt. Von den Zelllinien wurde die Zelllinie mit dem höchsten Expressionsniveau von VSG'Y' ausgewählt und wiederum mit dem linearisierten Vektor pTSArb(hyg).tVSG117:EGFP transfiziert. Von zehn Transfektionen führten sechs zu überlebenden Zellen, die alle in einem unterschiedlichen Ausmaß Fluoreszenz im ER und



**Abb. 13: Die Überexpression von GPI-verankerten Proteinen führt zu der Lokalisation von Fusionsproteinen auf der pellikularen Zellmembran:** Ein Teil der GFP-Fusionsproteine ist unter anderem auf der pellikularen Zelloberfläche festzustellen, insbesondere der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation eines der GFP-Fusionsproteine am Flagellum.

auf der Zelloberfläche aufwiesen. Um die Oberflächenlokalisierung der Fusionsproteine nachzuweisen, wurden die Zellen fixiert und ohne Permeabilisierung mit GFP-Antikörpern inkubiert. Abbildung 13 zeigt die Zellen in Falschfarben. Das intrazelluläre GFP der Reporterproteine ist rot abgebildet, während die Fluoreszenz durch den Sekundärantikörper grün zu sehen ist. Im Vergleich zu der Lokalisation von Kinetoplast und Zellkern erkennt man deutlich die endosomale Lokalisation der intrazellulären Markerproteine. Der große intrazelluläre Anteil des Markerproteins zeigt, dass der Sortierungsmechanismus, der den Oberflächenzugang der GFP-Fusionsproteine verhindert, gesättigt wurde, so dass ein Überschuss an GFP-Fusionsproteinen die Zelloberfläche erreichen. Zur Gegenfärbung wurden die Zellen mit Ethidiumbromid versetzt, um so den Kinetoplasten bei 595 nm sichtbar zu machen. Während VSG'Y' unbeeinträchtigt die Zelloberfläche und die Flagellartaschen sichtbar machte, war die Fluoreszenz durch GFP sowohl intrazellulär wie auch auf der gesamten Zelloberfläche nachweisbar. Zudem wiesen die Zellen nach wie vor eine starke Lokalisation von GFP im ER auf, was vermutlich auf das VSG117:GFP-Fusionsprotein zurückzuführen ist. Die Sättigung des Sortierungsmechanismus geschieht durch die Überexpression von verschiedenen GPI-verankerten Proteinen. Ob die Sortierung allerdings auf den amphipatischen Eigenschaften der GPI-Anker beruht oder durch eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung stattfindet, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

#### **4.1.5. Markierung von Organellen in lebenden Trypanosomen**

Bei der Analyse der intrazellulären Lokalisation von Proteinen ist der Vergleich mit organellspezifischen Markerproteinen entscheidend. Da ein Ziel dieser Arbeit war, die Analyse lebender Trypanosomen zu ermöglichen, wurden weitere Proteine durch Fluorophore markiert. Hierbei wurden Proteine ausgesucht, welche als zuverlässige Marker für einzelne Organellen gelten und zum Teil auf bereits etablierte Fusionsproteine zurückgegriffen. Hierdurch kann sowohl der Transport der jeweiligen Markerproteine wie auch der Transport von anderen Reporterproteinen wie EP1:GFP zu den jeweiligen Organellen in lebenden Trypanosomen beobachtet werden.



#### **4.1.5.1. Expression von VSG'Y' mit einer weiteren Resistenz**

Um die Lokalisation von GPI-verankerten Markerproteinen mit organellespezifischen Proteinen zu vergleichen müssen beide Fusionsproteine konstitutiv exprimiert werden. Um beide Allele des ribosomalen Promotors nutzen zu können wurde eine dritte Variante des pTSAr**ib** hergestellt.

Der Vektor pTSAr**ib**(blas).VSG'Y' wurde mit den Restriktionsenzymen *Dra* III linearisiert und die 3'-Überhänge der DNA wurden mit der T4-DNA-Polymerase entfernt. Durch *Xba* I wurde der offene Leserahmen des Cytidin-Deaminasegens ausgeschnitten. Die Kasse**tte** des Puromycinresistenz vermittelnden Gens wurde mithilfe der Primer Puro\_Xba**I**\_U4 und Puro\_Sna**BI**\_L4 auf Basis des Plasmides p221KO(puro) amplifiziert. Unter Verwendung der angefügten Restriktionsschnittstellen wurde das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid wurde pTSAr**ib**(puro).VSG'Y' (Tp.VY) genannt.

Nach fünf unabhängigen Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> wurden insgesamt fünf unterschiedliche Klone M1.2<sup>tet</sup><sub>Tp.VY</sub> erhalten. Alle Klone wiesen eine deutliche Oberflächenfluoreszenz auf.

#### **4.1.5.2. Markerproteine des Transportweges vom ER bis zum Golgi-Apparat**

Erst die gleichzeitige Expression von weiteren Markerproteinen macht es möglich, die Lokalisation von fluoreszierenden Markerproteinen zuverlässig zu bestimmen. Um auch die Analyse lebender Trypanosomen zu ermöglichen, ist die Verwendung weiterer Markerproteine notwendig.

##### **4.1.5.2.1 Das GFP-markierte Lektin TbERGIC-53 ist nahe des Golgi-Apparats lokalisierbar**

Das ER als Ort der Proteinbiosynthese von GPI-verankerten Proteinen ist das erste Organell im sekretorischen Transportweg, das durch fluoreszierende Markerproteine sichtbar gemacht werden kann. Um die ersten Schritte der Proteinsortierung während des Transportes zum Golgi-Apparat zu untersuchen wurde ein Fusionsprotein basierend auf TbERGIC-53 hergestellt.

ERGIC-53 ist ein Mannose-Lektin, das in *Rattus norvegicus* charakterisiert wurde und für das *ER-Golgi-intermediate compartment* (ERGIC) spezifisch ist (Schweizer *et al.*, 1988). Es fungiert als Mannoselektin (Itin *et al.*, 1996) mit breitem Ligandenspektrum (Kamiya *et al.*, 2008) und ist an dem Transport von verschiedenen Proteinen wie den Blutgerinnungsfaktoren V und VIII (Moussalli *et al.*, 1999), Cathepsin C und Z (Nichols *et al.*, 1998; Vollenweider *et al.*, 1998; Appenzeller *et al.*, 1999), 1-Antitrypsin (Nyfeler *et al.*, 2008) und SUMF1 (Fraldi *et al.*, 2008) beteiligt.

Um das orthologe Protein zu ERGIC-53 in *T. brucei* zu ermitteln, wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Bei der Beurteilung der resultierenden E-Werte wird angenommen, dass ein E-Wert von  $10^{-7}$  oder weniger eine zuverlässige Homologie der Proteine bedeutet.

Mithilfe der ERGIC-53/LMAN1 Proteinsequenz (NCBI: NP\_005561; *H. sapiens*) wurde die Sequenz Tb11.02.1680 mit einem E-Wert von  $2,8 \times 10^{-33}$  als Ortholog zu LMAN1 ermittelt. Die weiteren möglichen homologen Gene codieren zwar ebenfalls vermutlich Lektine, weisen aber einen um 20 Größenordnungen höheren E-Wert von  $9,9 \times 10^{-12}$  auf und wurden deshalb nicht ausgewählt (Abb. 14).

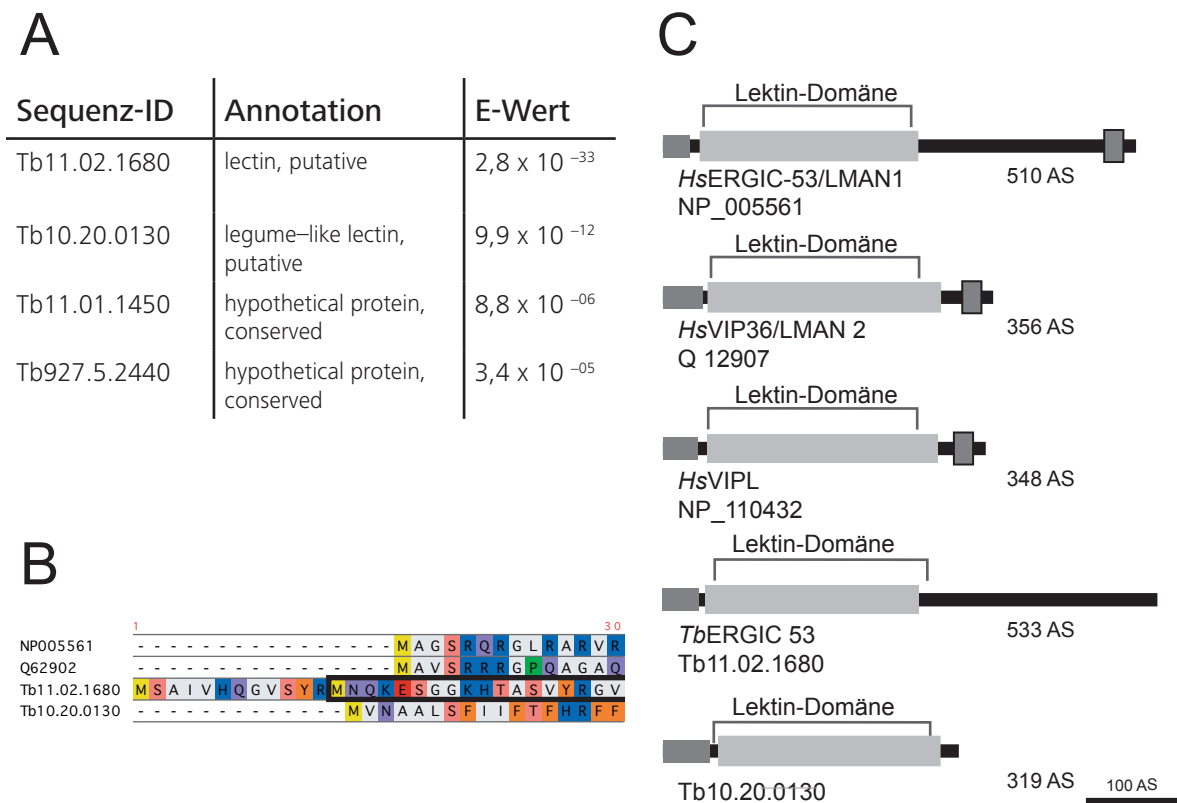
Zur Bestätigung der gefundenen Sequenz wurde eine BLAST-Suche nach humanen Orthologen von Tb11.02.1680 durchgeführt, die wiederum zu ERGIC-53/LMAN1 als wahrscheinliches Ortholog führte. Anschließend wurden die mittels SMART-Analyse bestimmten Lektindomänen verglichen. Tb11.02.1680 weist eine Lektindomäne auf, deren beiden Termini mit denen der Lektindomänen von ERGIC-53 (Q62902, *R. norvegicus*) und ERGIC-53/LMAN1 übereinstimmen. Während die kompletten offenen Leseraster von LMAN1 und Tb11.02.1680 eine Identität von 16% aufweisen, besitzen die beiden Lektindomänen eine Identität von 25%. Das Alignment von Tb11.02.1680 mit der humanen Sequenz von ERGIC-53/LMAN1 wird in Abbildung 15A gezeigt.

Bei der SMART-Analyse für Tb11.02.1680 führt die SMART-Analyse allerdings zu keiner Signalsequenz, so dass das Protein theoretisch zytosolisch sein sollte. Bei der näheren Betrachtung fällt allerdings ein alternatives Startcodon auf (N37-39). Diese verkürzte Sequenz weist eine Signalsequenz auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die verkürzte Sequenz von Tb11.02.1680 im Verlauf der weiteren Arbeit *TbERGIC-53* genannt.

ERGIC-53 wurde in Säugerzellen bereits mit GFP markiert (Ben-Tekaya *et al.*, 2005). Analog zu diesem Fusionsprotein wurde GFP an den N-Terminus des prozessierten *TbERGIC* fusioniert. Um die Translokation in das ER zu gewährleisten wurde die Signalsequenz des VSG117 an den N-Terminus des GFPs angefügt.

Die drei Genfragmente Signalsequenz117, GFP und ERGIC wurden jeweils mittels PCR hergestellt und durch *overlap extension PCR* (OE-PCR) komplett amplifiziert. Abbildung 15B zeigt eine schematische Übersicht über das hergestellte Fusionsprotein.

Für die cotranslationale Translokation in das ER wurde die Signalsequenz von VSG117 mit den Primern 117LS\_HindIII\_U1 und 117LS\_PstI\_GFP\_L1 amplifiziert. Durch die Primer wurden die ersten 102 Nukleotide des offenen Leserasters von VSG117 amplifiziert und direkt vor dem Startcodon eine *Hind* III-Schnittstelle eingefügt. Der korrespondierende Primer entspricht den letzten 20 Nukleotiden des Fragmentes und fügt eine stillen Mutation in dem letzten Triplet ein (GCT statt GCC), um eine *Pst* I-Schnittstelle zwischen Signalsequenz und *gfp* einzufügen. Hieran schließt sich direkt die Sequenz der Nukleotide 3-21 von *gfp* an.



**Abb. 14: Ermittlung von *Tb*ERGIC-53 aufgrund von Sequenzanalysen.** A) BLAST-Ergebnisse nach Suche auf Grundlage der Sequenz NP\_005561. B) N-Terminus der ausgewählten Sequenz Tb11.02.1680 mit alternativen Startcodon (entspricht in den weiteren Verlauf dem ATG N1-3). Die Verkürzung des Proteins um 12 AS führt zur Berechnung einer Signalsequenz am N-Terminus (AS 1-40 des alternativen Proteines). C) Vergleich der Domänenstruktur von NP\_005561 (*H. sapiens*), Q62902 (*R. norvegicus*), Tb11.02.1680 und Tb10.20.0130 (beide *T. brucei*) B) Vergleich der SMART-Analysen der drei Gene für Leguminosen-ähnliche Lektine mit den beiden durch BLAST-Suche ermittelten Sequenzen von *T. brucei*. Die spezifische ERGIC-53-Domäne tritt in ERGIC-53 und Tb11.02.1680 auf, während die Lektindomäne in den anderen drei Sequenzen als VIP63-Domäne bestimmt wird. Allerdings sind bei beiden trypanosomalen Sequenzen die E-Werte sehr hoch, so daß eine zweifelsfreier Zuordnung alleine aus der Domänenerkennung kaum gewonnen werden kann. Ein Vergleich der generellen Domänenstruktur zeigt aber eine große strukturelle Übereinstimmung in Bezug auf die Lektindomänen inklusive der wenig wahrscheinlichen GTPasen-Domäne. In den trypanosomalen Proteinen scheinen die Transmembrandomänen zu fehlen. Die Klammer markiert die Lektindomäne, dunkle Vierecke markieren die Signalpeptide und Vierecke mit Rahmen die Transmembrandomänen. Die weiteren Domänen wurden von der SMART-Analyse aus verschiedenen Gründen verworfen.



Das offene Leseraster von GFP wurde durch die Primer 117LS\_PstI\_GFP\_U1 (vollständig korrespondierend zu 117LS\_PstI\_GFP\_L1) und den Primer GFP\_EheI\_ERGIC\_L1 amplifiziert und durch die PCR mit überlappenden Sequenzen zur Signalsequenz von VSG117 versehen. Hierbei wurde die Aminosäure 238 Tyrosin zu einem Glycin mutiert und direkt anschließend die Sequenz von *Tbergic-53* angefügt. Aufgrund der Deletion der ursprünglichen Signalsequenz entspricht dieses Fragment der codierenden Sequenz von *Tbergic-53* ab der Aminosäure 39. Dieses Fragment wurde mittels der Primer GFP\_EheI\_ERGIC\_U1 (vollständig korrespondierend zu GFP\_EheI\_ERGIC\_L1) und ERGIC\_BamHI\_L1 amplifiziert. Die OE-PCR wurde zunächst mit der Signalsequenz und *gfp* durchgeführt und das Fusionsgen anschließend mit einer weiteren OE-PCR mit dem Fragment von *Tbergic-53* kombiniert. Das durch die Primer 117LS\_HindIII\_U1 und ERGIC\_BamHI\_L1 amplifizierte Fusionsgen wurde mit den Enzymen *Hind* III und *Bam*HI geschnitten und in die Expressionsvektoren pTSArif(puro), pTSArif(hyg) und pTSArif(blas) ligiert.

Bei der nachfolgenden Sequenzierung des finalen Plasmids wurde festgestellt, dass durch die PCR eine Mutation der Aminosäure 30 (Nukleotid 88) verursacht worden war. Das native Prolin war zu einem Serin mutiert worden. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt bereits die eindeutige Lokalisation des Fusionsproteins in *T. brucei* feststellbar. Die konkrete Lokalisation des Proteins macht eine zytoplasmatische Fehllokalisierung allerdings sehr unwahrscheinlich und ist ein Hinweis für die erfolgte Translokation. Da die mutierte Aminosäure direkt nach der Translokation mit dem Signalpeptid entfernt wird, ist ein Einfluss auf die Lokalisation oder Funktion innerhalb des sekretorischen Transportweges unwahrscheinlich. Bezüglich des offenen Leserasters von *Tb*ERGIC-53 zeigte die Sequenzierung, dass sich die Sequenzen von AnTat1.1 und TREU927 in einigen Nukleotiden unterscheiden. Insgesamt 13 Mutationen verteilen sich auf das offene Leseraster, wobei 8 davon stille Mutationen sind. Die verbliebenen Mutationen sind die Deletion von D182 sowie die Mutationen Q349 zu E348, G350 zu R349, S364 zu P363 und A348 zu V347. Die Nummerierung bezieht sich jeweils auf das prozessierte Protein nach Abspaltung des Signalpeptides. Der Bereich bis AS 117 mit zwei stillen Mutationen ist bei der Herstellung des RNAi-Vektors noch einmal aus der genomischen DNA amplifiziert worden und stimmte zu 100% mit dem kompletten offenen Leseraster von *Tb*ERGIC-53 überein. Alle Mutationen sind auf der Plasmidkarte im Anhang eingezeichnet.

Die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> wurde mit dem Vektor pTSArif(puro).GFP:ERGIC transfiziert. Durch direkt anschließende *limiting dilution* der transfizierten Zellen wurden durch insgesamt zwei Transfektionen drei unterschiedliche klonale Zelllinien gewonnen, von denen eine allerdings keine detektierbare Fluoreszenz aufwies. Die anderen beiden Klone wurden für weitere Analysen verwendet. In beiden Zelllinien ist die Fluoreszenz punktuell im posterioren Teil der Zelle festzustellen. Durch Immunofluoreszenz gegen das ER-Chaperon BiP konnte eine Lokalisation des Lektins direkt neben dem ER festgestellt werden (Abb. 15C).

#### 4.1.5.2.2. Das Transmembranprotein GntB56:YFP befindet sich in BSF im Golgi-Apparat

Um die mögliche Sortierung von Proteinen aufgrund ihrer Verankerung zwischen ER und Golgi-Apparat näher untersuchen zu können, wurden zwei weitere Reporterproteine eingesetzt. Sowohl das Protein *TbGRASP55* als auch die Glucose-N-Acetyl-Transferase *TbGntB* konnten in prozyklischen Trypanosomen im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (He *et al.*, 2004). Beide Proteine wurden als fluoreszierende Fusionsproteine zur Markierung des Golgi-Apparates eingesetzt.

Das Gen für GntB56:YFP stammte aus dem Vektor pXS2.GntB56:YFP (Graham Warren, Wien) und wurde zunächst mit *Hind* III und *Eco*R I geschnitten wurde und in den ebenso behandelten Vektor pBSKmcs.800 ligiert wurde. Diese Variante des bekannten pBSK II<sup>+</sup> weist eine *Bgl* II-Schnittstelle zwischen den Schnittstellen der Enzyme *Xba* I und *Not* I in der *multiple cloning site* auf, die durch PCR eingefügt worden war. Dies erleichtert die nachfolgende Klonierung von DNA-Fragmenten mit den Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *Bgl* II.

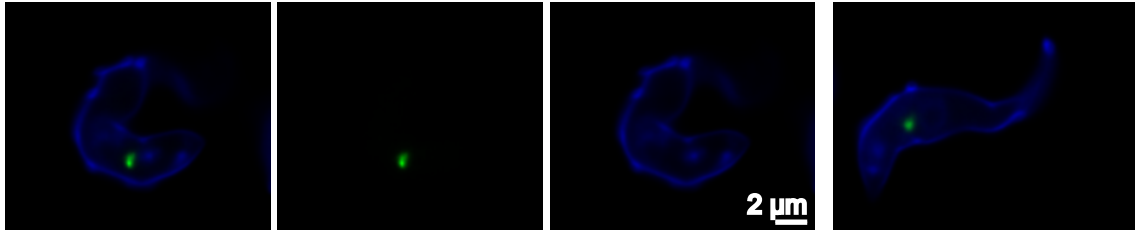
Nach Herstellung des Plasmides pBSK.mcs.GntB56:YFP wurde das offene Leseraster mit den Enzymen *Hind* III und *Bgl* II herausgeschnitten und in die Vektoren pTSArif(puro), pTSArif(blas) und pTSArif(hyg) kloniert, die alle mit den Enzymen *Hind* III und *Bam*H I behandelt worden waren.

Drei unabhängige Transfektionen mit dem Vektor pTSArif(puro).GntB56:YFP führten zu insgesamt vier klonalen Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>Ip.GnY</sub>, die alle eine deutliche YFP-Fluoreszenz aufwiesen. Abb. 16 zeigt die durch diese Transfektion gewonnenen Zellen.

Das GRASP-Fusionsprotein sollte ebenfalls wie beschrieben (He *et al.*, 2004) hergestellt werden, indem eine fluoreszierende Domäne an den N-Terminus angefügt wurde. Um die bisher erwähnten Markerproteine gleichzeitig mit dem hier hergestellten Fusionsprotein verwenden zu können, wurde DsRed2 als Marker ausgewählt. Deshalb wurde das Fusionsgen neu kloniert. Die codierende Sequenz von GRASP wurde mit den Primern GRASP\_HindIII\_U1 und GRASP\_NheI\_L1 aufgrund der genomischen DNA von AnTat1.1 (A1.1) amplifiziert und anschließend mit *Nhe* I und *Hind* III geschnitten. Dieses Fragment wurde in den Vektor pDsRed2 ligiert, der zuvor mit *Hinc* II und *Hind* III geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid pGRASP:DsRed wurde sequenziert und anschließend mit *Not* I und *Hind* III geschnitten. Das DNA-Fragment wurde mit pTSArif(puro) ligiert, das zuvor mit *Bam*H I und *Hind* III behandelt worden war. Der Vektor pTSArif(puro).GRASP:DsRed wurde mit *Sph* I linearisiert.

In drei unabhängigen Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup> konnten insgesamt zwei klonale Zelllinien gewonnen werden, die DsRed exprimierten. Allerdings unterschieden sich die Expressionsniveaus zwischen den beiden Klonen beträchtlich. Das Expressionsniveau lag zum Teil nah an der Detektionsgrenze des Mikroskops. Da DsRed nach einer Fixierung mit





**Abb. 16: Markierung des Golgi-Apparates:** Die Expression von GntB:YFP ermöglicht die Lokalisierung des Golgi-Apparates in lebenden Trypanosomen. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast) & AMCA (VSG), Grün: GntB:YFP

Paraformaldehyd nicht mehr fluoresziert, erschwert die Untersuchung lebender Zellen die genaue Analyse. Deshalb wurde GRASP:DsRed als Markerprotein verworfen.

#### 4.1.5.3. p67WT:GFP ist in BSF ein Markerprotein für das Lysosom

Das Lysosom ist das Organell in Trypanosomen, zu dem GPI-verankerte Proteine nach Recycling zum Abbau transportiert werden, sofern sie nicht durch *shedding* von der Zelloberfläche abgelöst werden. Das Transmembranprotein p67 befindet sich sowohl in Blutstrom- wie in prozyklischen Trypanosomen im Lysosom, obwohl sich sein Transportweg zum Lysosom zwischen beiden Lebensstadien unterscheidet (Brickman und Balber 1994; Kelley *et al.*, 1999). In prozyklischen Trypanosomen wurde eine GFP-markierte Variante von p67 charakterisiert (Tazeh und Bangs 2007). Dieses Fusionsprotein GFP.p67WT besteht aus der Signalsequenz der Prozyklin Isoform EP2-3, dem daran anschließenden GFP und den letzten 132 Nukleotiden des offenen Leserasters von p67, welches die Transmembrandomäne des Proteins codiert.

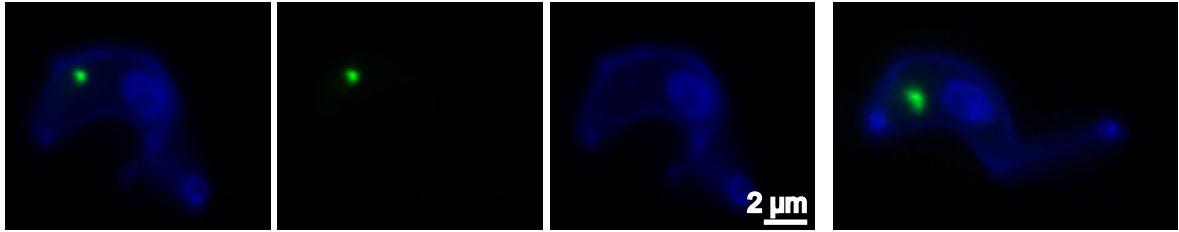
Aus dem Vektor pXS5.GFP.p67WT wurde das offene Leseraster mit *Hind* III und *Eco*R I herausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen pBSK:mcs.800 kloniert. Im Folgenden wurde das Protein p67WT:GFP genannt und der entstandene Vektor demnach pBSK.mcs.p67WT:GFP. Das Gen-Fragment wurde mit *Hind* III und *Bgl* II aus dem Plasmid herausgeschnitten und mit allen drei Varianten des Expressionsvektors pTSArif ligiert. Die Ligation in alle Varianten von pTSArif ermöglicht jede gewünschte Kombination mit anderen Vektoren.

Die Transfektion mit pTSArif(puro).p67WT:GFP führte in zwei Ansätzen zu insgesamt vier resistenten Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>Tp.G67</sub>, die alle eine deutliche GFP-Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 17).

#### 4.1.5.4. Herstellung von Zelllinien mit mehreren Markerproteinen

Bei der Betrachtung lebender Trypanosomen ist die Kombination verschiedener Markerproteine notwendig. Zudem wurden parallel Versuche zur Segregation der Organellen in einem anderen Projekt geplant. Zu diesem Zweck mussten zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarker und Expressionsvektoren mit zwei unterschiedlichen resistenzvermittelnden Genen





**Abb. 17: Markierung des Lysosoms:** Die Expression von p67WT:GFP ermöglicht die Lokalisierung des Lysosoms in lebenden Trypanosomen. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast) & AMCA (VSG), Grün: p67WT:GFP.

verwendet werden. Die Vektoren pTSArb(hyg) und pTSArb(puro) wurden hierzu ausgewählt. Als Fluoreszenzmarker kam nur GRASP:DsRed in Kombination von mit allen anderen Markerproteinen in Frage, da sich die Anregungs- und Emissionsspektren von YFP und GFP für eine saubere Differenzierung zu sehr überschneiden.

Die Transfektion wurde mit dem erst während der Arbeit zur Verfügung stehenden Elektroporationsgerät von AMAXA vorgenommen und die Zellen sofort nach Transfektion in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 vereinzelt. Dieses Gerät erreicht laut Hersteller eine um drei Größenordnungen höhere Transfektionseffizienz als das herkömmliche Gerät BTX 630. Ein Teil dieser Effizienz beruht auf einer speziellen Transfektionsreagenz, das auf den jeweiligen Zelltypus abgestimmt ist. Im Fall von Trypanosomen werden die Lösungen für humane T-Zellen oder für Parasiten I empfohlen.

Die gleichzeitige Transfektion von M1.2 mit den Vektoren pTSArb(puro).GRASP:DsRed und pTSArb(hyg).GFP:ERGIC führte zu insgesamt 11 Klonen, die sowohl gegen Hygromycin als auch gegen Puromycin resistent waren. Die Transfektionseffizienz war um eine Größenordnung niedriger als erwartet. Dies zeigte sich auch bei den anderen Transfektionen, so dass dies auf zwei Faktoren zurückgeführt werden kann: zum einen senkt die sofortige Verdünnung der Zellen nach Transfektion zur Gewährleistung der Unabhängigkeit der Klone laut Hersteller die Effizienz, zum anderen zieht die Doppeltransfektion zwei voneinander unabhängige Rekombinationsereignisse als Bedingung für rekombinante Zelllinien voraus.

Für die weitere Analyse wurde der einzige Klon der 1:100-Verdünnung verwendet. Die Analyse der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte in allen Fällen eine starke GFP-Fluoreszenz und eine schwache DsRed-Fluoreszenz, die nahe der Detektionsgrenze lag. Die gleichzeitige Transfektion von M1.2 WT mit pTSArb(hyg).p67WT:GFP und pTSArb(puro).GRASP:DsRed führte zu insgesamt 17 Zelllinien. Von diesen stammten zwei aus der 1:100 Verdünnung. Alle resistenten Zelllinien wiesen eine starke GFP-Fluoreszenz auf, während nur ein Teil der Zelllinien nachweislich DsRed exprimierte. Dabei ist aber zu beachten, dass die Expression von GRASP:DsRed sehr nah an der Detektionsgrenze lag und die Detektion durch die Bewegung der Zellen erschwert wird.

#### 4.1.6. Die Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz

An dem Transport von sekretorischen Proteinen sind eine Vielzahl von Proteinen direkt und regulierend beteiligt. Potentiell ist ein großer Teil dieser Proteine überlebensnotwendig, wodurch die klassische Methode des *Gen-knock outs* nicht genutzt werden kann. RNA-Interferenz ermöglicht hingegen die induzierbare Unterdrückung eines Gens als *knock down* und zeigt so die unmittelbaren Folgen der Proteindefizienz. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *high-throughput* Screeningverfahrens, um Proteine zu ermitteln, die am *Trafficking* von GPI-verankerten Proteinen beteiligt sind. Die Eignung der erzeugten fluoreszierenden Reporterzelllinien für induzierbare RNA-Interferenz sollte deshalb zunächst exemplarisch gezeigt werden.

Zur Durchführung der RNA-Interferenz mit stabilen RNAi-Vektoren wurden die Zellen mit dem Vektor p2T7 transfiziert (Abb. 18). Die Expression von doppelsträngiger RNA durch p2T7 basiert auf zwei gegenüberliegenden T7-Promotoren, die jeweils durch einen Tetrazyklin-Repressor reguliert werden (LaCount *et al.*, 2000). Durch zwei aufeinander folgende Transkriptionsterminatoren strangaufwärts der beiden T7-Promotoren wurde die Transkription aufgrund des gegenüberliegenden T7-Promotors auf den Bereich zwischen der beiden Promotoren inklusive der Promotoren-Sequenzen begrenzt. Zwischen den beiden T7-Promotoren liegt eine *multiple cloning site*, von der bei den meisten Konstrukten die Schnittstellen *Hind* III und *Bam*H I verwendet wurden. Als Alternativ zu diesem Vektor lag ein *hairpin*-Vektor vor. Dieser *hairpin*-Vektor erfordert das Vorliegen der Sequenz strangaufwärts des linkers und das Vorliegen der reversen Sequenz strangabwärts des linkers, welcher durch den *hairpin* bildet und so die Bildung der doppelsträngigen RNA ermöglicht. Da die Reporterzelllinien in einem *high throughput* Assay getestet werden sollten sollte der Aufwand, zu jedem Zielprotein die komplexe Klonierung eines *hairpin*-Vektors vorzunehmen, vermieden werden.

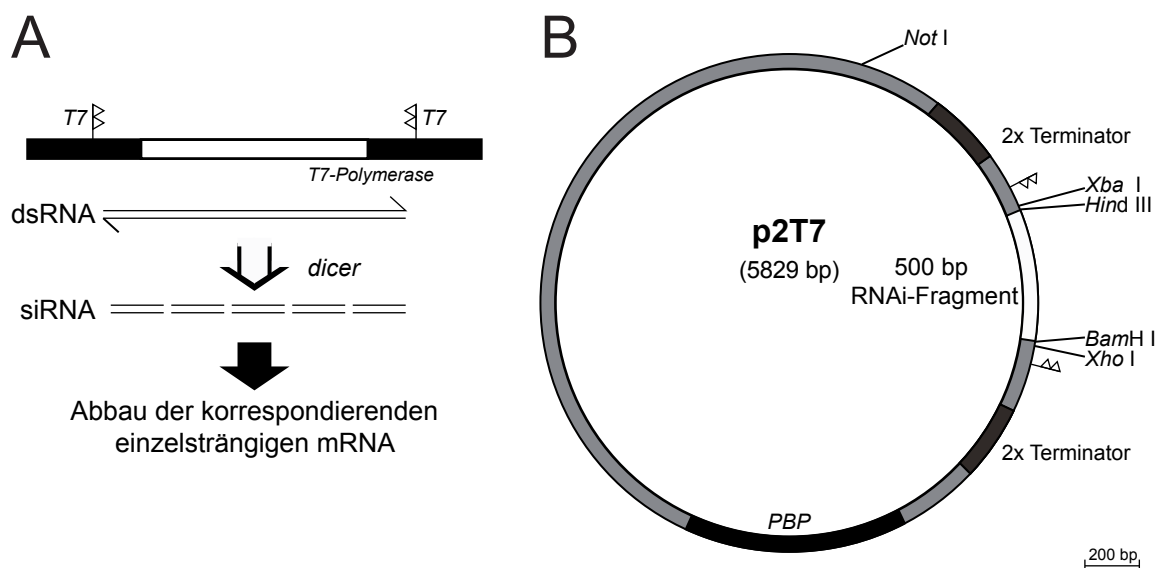


Abb. 18: RNA-Interferenz und der hierzu verwendete Vektor p2T7.

Um zu zeigen, dass die hergestellten Markerzelllinien für ein *Screening* geeignet sind, wurden Zielsequenzen gesucht, die einen möglichst pleiotropen und wenn möglich letalen Effekt hervorrufen würden, so dass die Verdopplungszeit der Kultur als Maß für die Stringenz der Repression durch den Tetrazyklinrepressor dienen konnte. Das Problem der unvollständigen Repression lässt sich in diesem Rahmen nie ganz vermeiden, so dass nur eine möglichst vollständige Repression erreicht werden kann.

#### **4.1.6.1. HSP60 ist essentiell für BSF**

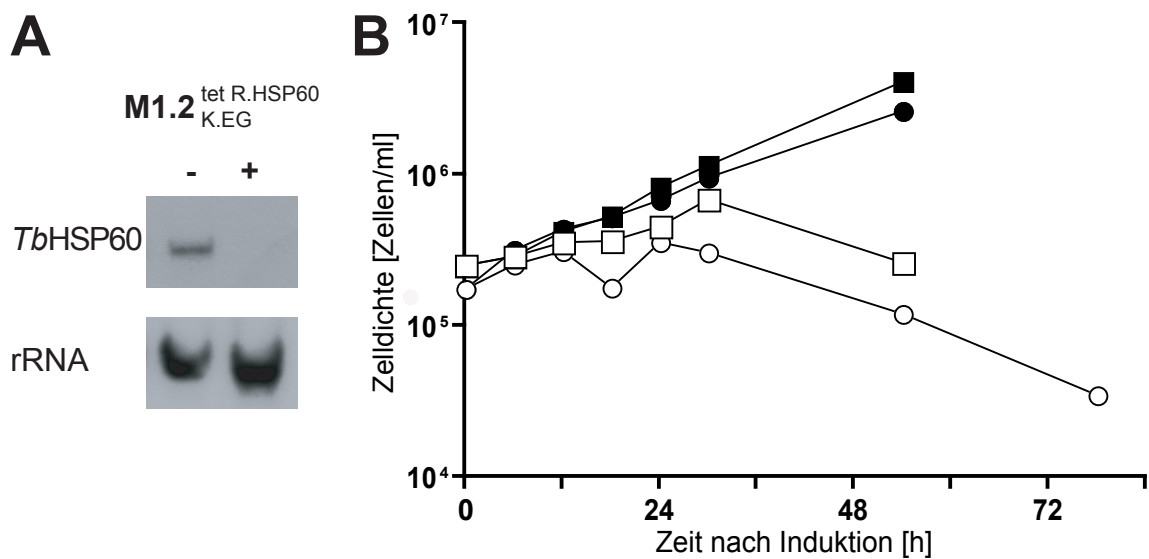
Bei der Auswahl von essentiellen Proteinen, deren *knock down* zu einem letalen Phänotyp führen sollte, wurde vor allem solche in Betracht gezogen, die potentiell am Membranverkehr in der Zelle beteiligt sind.

Die erste Wahl fiel auf das Hitzeschockprotein 60 (HSP60). Dieses hochkonservierte Chaperon spielt eine Rolle bei der Korrektur von missgefalteten Proteinen und bei der Faltung von Proteinen nach Eintritt in die mitochondriale Matrix (Hartl *et al.*, 1992; zusammengefasst in Deocaris *et al.*, 2006). Zudem ist HSP60 auf der Plasmamembran von Säugerzellen und in sekretorischen Granulae nachgewiesen worden. In *T. brucei* ist es zudem in der Flagellartasche gefunden worden (Radwanska *et al.*, 2000).

In der Flagellartasche findet die Trennung von VSG und EP1:GFP statt. Deshalb wurde HSP60 als erstes Ziel für die Interferenz ausgewählt. Zudem war die Sequenz von HSP60 (Tb10.70.0430) bereits bekannt (Bringaud *et al.*, 1995).

Die Primer HSP60\_HindIII\_U1 und HSP60\_BamHI\_L1 ermöglichten die Amplifikation der Nukleotide 64 bis 600 von HSP60. Diese Sequenz codiert für die Aminosäuren 21 bis 200 von HSP60 und umfasst damit den N-Terminus des 555 AS großen Proteins. Der resultierende Vektor p2T7.HSP60 wurde für die nachfolgenden Transfektionen genutzt. Die Transfektion der Zelllinie M1.2<sub>K,EG</sub><sup>tet</sup> mit dem Vektor p2T7.HSP60 ergab zwei Zelllinien bei fünf unabhängigen Transfektionen. Der spezifische Abbau der mRNA von HSP60 in einer der beiden Populationen wurde durch Hybridisierung von Northern Blots nachgewiesen. Nach 8 h Induktion wurde Gesamt-RNA aus einer induzierten Kultur und aus einer nichtinduzierten Kontrollkultur extrahiert und nach Transfer auf eine Hybond-N-Membran mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert. Zur Sondenherstellung wurde das PCR-Produkt der beiden oben beschriebenen Primer mit dem Plasmid pBSK.HSP60 genutzt. Abbildung 19A zeigt den Blot nach 28 Tagen Exposition sowie die Banden der als Kontrollsonde eingesetzten rRNA-Sonde nach 6 h Exposition.

Nach Induktion der RNA-Interferenz nahm die Verdopplungszeit der Population zu. Nach 24 h nahm die Zelldichte der induzierten Kultur ab und die Zellen verloren ihre schmale Form. Nach 48 h waren sämtliche überlebenden Zellen an beiden Zellpolen deformiert. Das Populationswachstum der induzierten Zellen ist in Abbildung 19B dargestellt. Während die Kontrollkulturen einer Verdopplungszeit von 12-14 h aufwiesen, wuchsen die induzierten

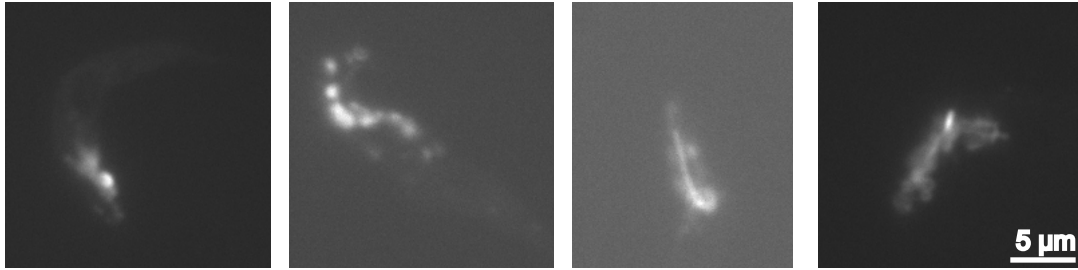


**Abb. 19: RNA-Interferenz gegen *TbHSP60*:** A) Wachstum von M1.2<sup>tet R.HSP60 K.EG</sup> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen. B) Hybridisierung der mRNA von HSP60, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert.

Populationen nur bis etwa 24-30 h nach Induktion. Bereits während dieser Zeit zeigte sich eine deutliche Verlangsamung des Populationswachstums. Nach etwa 30 h starben beide Populationen langsam ab, bis etwa 72 h nach Induktion nur noch wenige, stark beeinträchtigte Zellen beobachtbar waren. Die induzierten Kulturen erholten sich trotz längerer Inkubation nicht von der Anwesenheit von Tetrazyklin.

Nach 18 h Induktion zeigten die Zellen eine stark veränderte Lokalisation von EP1:GFP. Während in den nichtinduzierten Zellen EP1:GFP in zwei bis drei konkreten Strukturen zwischen Lysosom und Flagellartasche akkumuliert, zeigten die Zellen nach *knock down* von HSP60 eine sehr viel weitläufigere Verteilung von EP1:GFP. Aufgrund dieser weiträumigen Verteilung von EP1:GFP zwischen Flagellartasche und Zellkern in den induzierten Zellen ist es schwierig, die genaue Lokalisation von EP1:GFP genauer zu bestimmen (Abb. 20). Zudem bildeten die Zellen zunehmend große Aggregate, die wahrscheinlich durch unvollständige Zytokinese entstehen. In keinem beobachteten Fall jedoch konnte eine Oberflächenlokalisierung des Markerproteins nachgewiesen werden.

Nach 24 h Induktion wurden Proteinlysate hergestellt und über Immunodetektion die relative Menge an HSP60 nachgewiesen. Da zu diesem Zeitpunkt die induzierte Zellkultur aufgrund der Induktion abzusterben begann dürfte die Menge an vorhandenem HSP60 zu diesem Zeitpunkt ein für die Zelle kritisches Niveau erreicht haben. Durch gleichzeitigen Nachweis mit dem Antikörper gegen die membrangebundene saure Phosphatase MBAP1 wurde die Menge an HSP60 in den induzierten Zellen mit der in nichtinduzierten Zellen verglichen. Die Analyse der Fluoreszenzstärken ergaben eine Reduktion des HSP60 auf etwa



**Abb. 20: Auswirkungen der RNA-Interferenz gegen *Tb*HSP60 auf die Lokalisation von EP1:GFP.** A-D) Die Lokalisation GFP-Fluoreszenz der Zellen nach 18 h (A,B) bzw. 24 h Induktion (C,D) ist stark beeinträchtigt.

17% nach 24 h Induktion. Trotz der gleichen Mengen an Zellen, die für die Proteinisolierung verwendet wurden, unterscheidet sich die absolute Menge an MBAP in beiden Proben um den Faktor 1,5. Eine mögliche Erklärung ist hier, dass die Aggregate den Abgleich der Proteinmenge anhand der Zellzahl verfälschen. Die Reduzierung der Menge an HSP60 auf etwa 17% zeigt jedoch deutlich, dass die hergestellten Zellen den gewünschten *knock down* von HSP60 zeigen.

#### **4.1.6.2. Mangel an saurer Sphingomyelinase beeinträchtigt die Morphologie von BSF**

Da die Lokalisation von EP1:EGFP nach *knock down* von HSP60 nicht näher analysierbar war, wurde ein weiteres essentielles Protein herunterreguliert. In diesem Fall wurde die Zusammensetzung der Lipidmembran gestört.

Sphingolipide bieten in *T. brucei* einen möglichen Ansatzpunkt zur Charakterisierung der Transportwege von GPI-verankerten Proteinen, da sie in sogenannten DRMs (*detergent-resistant membrane microdomains*) konzentriert nachgewiesen wurde. Es wurde postuliert, dass DRMs an der Sortierung von GPI-verankerten Proteinen beteiligt sein könnten (Fivaz *et al.*, 2002). Die Störung des Sphingolipidhaushalts der Zellen ist dadurch möglich, *T. brucei* keine eigenen Ceramide synthetisiert, sondern diese ausschließlich vom Säugerkörper durch die Spaltung von Sphingomyelin aus LDL-Partikeln gewinnt. Dadurch hängt das Wachstum von Blutstromformen direkt von der Konzentration von LDL-Partikeln im Medium ab (Coppens *et al.*, 1995), wobei nicht zwischen den einzelnen Bestandteilen der LDL-Partikel unterschieden worden war. Der Abbau von Sphingomyelin erfolgt in eukaryotischen Zellen durch die saure Sphingomyelinase im Lysosom. Eine Sekretion von sauren Sphingomyelinasen wurde in Endothelzellen durch Zytokine ausgelöst (Marathe *et al.*, 1998). In *T. brucei* ist über die genaue Lokalisation der sauren Sphingomyelinase nichts bekannt. Der *knock down* dieses Enzyms in *T. brucei* sollte demnach die Lipidzusammensetzung der Zelle stark beeinflussen, da Sphingomyelin angereichert wird und keine Ceramide mehr hergestellt werden.

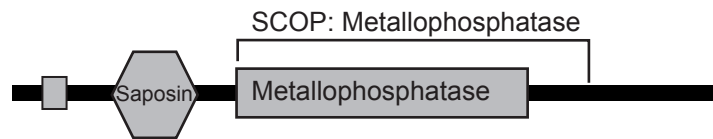
Zur Identifikation des Gens der sauren Sphingomyelinase in *T. brucei* (Abb. 21A) wurde eine BLAST-Suche mit der Sequenz der humanen sauren Sphingomyelinase (NP\_000534)

## A

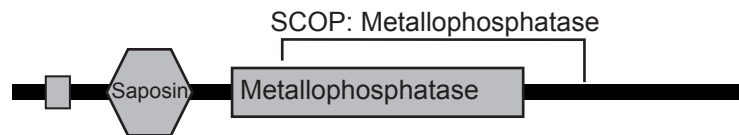
Sequenz-ID	Annotation	E-Wert
Tb927.4.1120	hypothetical protein, conserved	$3,0 \times 10^{-16}$
Tb927.4.1110	hypothetical protein, conserved	$7,6 \times 10^{-16}$
Tb927.7.2020	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	$4,2 \times 10^{-07}$
Tb927.7.2010	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	$4,3 \times 10^{-07}$
Tb11.02.5060	SNF2 DNA repair protein, putative	$1,0 \times 10^{-06}$
Tb927.7.2000	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	$1,1 \times 10^{-06}$
Tb09.211.4440	hypothetical protein, conserved	$1,2 \times 10^{-06}$

## B

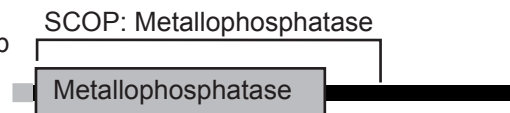
saure Sphingomyelinase 1  
*H. sapiens*  
Präprotein  
NP\_000534



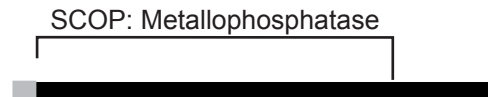
saure Sphingomyelinase  
*M. musculus*  
Pro-Protein  
NP\_035551



saure Sphingomyelinase 3b  
*H. sapiens*  
Pro-Protein  
NP\_055289.2



saure Sphingomyelinase  
*T. brucei*  
Pro-Protein  
Tb927.4.1110

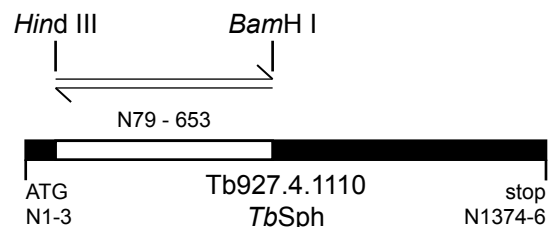


saure Sphingomyelinase  
*T. brucei*  
Pro-Protein  
Tb927.4.1120



200 bp

## C



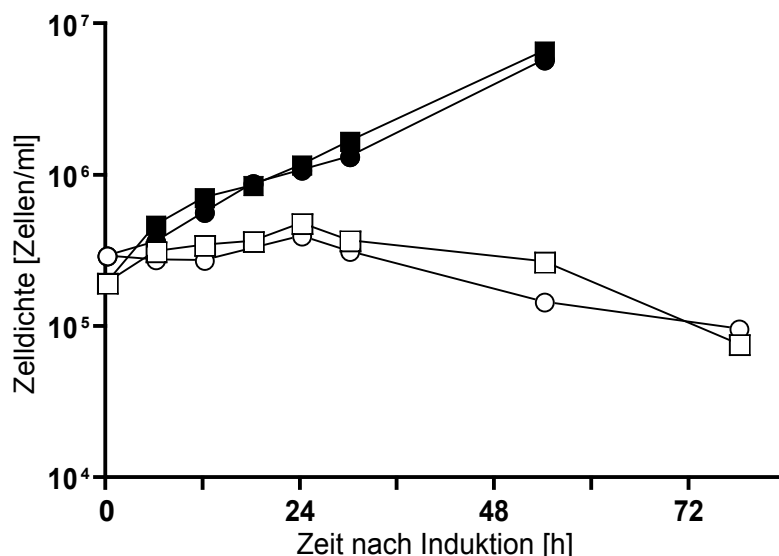
**Abb. 21: *In silico*-Identifizierung der Sphingomyelinase:** A) Ergebnisse der BLAST-Suche. B) Vergleichende SMART-Analyse der unterschiedlichen Sequenzen der sauren Sphingomyelinase. Die BLAST-Suche nach der trypanosomalen Sequenz wurde mit den Sequenzen NP\_000534 (*H. sapiens*) und NP\_035551 (*M. musculus*) durchgeführt. Eine zweite BLAST-Suche mit der trypanosomalen Sequenz Tb927.4.1110 führte zu der Isoform 3B (NP\_055289.2). Die hellen Rechtecke kennzeichnen die Signalpeptide der Proteine, die umrandeten Rechtecke Transmembrandomänen. Die Klammer zeigt in fast allen Sequenzen die Domäne SCOP: d1utea mit Ausnahme der Sequenz Tb927.4.1120 an. In dieser Sequenz tritt die nicht näher charakterisierte Domäne d2mev2 auf. Die E-Werte der SCOP-Domäne

vorgenommen. Diese Suche führte zu den zwei Sequenzen Tb927.4.1120 und Tb927.4.1110, die einen ähnlichen E-Wert von etwa  $10^{-16}$  aufweisen.

Beide Sequenzen wurden durch SMART-Analyse näher analysiert. Während Tb927.4.1120 eine Signalsequenz und eine Transmembrandomäne - unter Vernachlässigung einer SCOP-Domäne mit dem E-Wert  $5,3 \times 10^{-1}$  - aufwies, zeigte Tb927.4.1110 eine Homologie mit der Metallophosphatase-SCOP-Domäne. Die Homologie weist einen E-Wert von  $8 \times 10^{-9}$  auf.

Um die Identität von Tb927.4.1110 weiter zu untermauern wurde mithilfe der Sequenz eine BLAST-Analyse mit der humanen Sequenzdatenbank vorgenommen (Abb. 21B). Das beste Ergebnis ist NP\_055289.2 mit einem E-Wert von  $2 \times 10^{-19}$ . Das Gen ist als "saure Phosphatase-ähnliche Phosphodiesterase 3b" identifiziert, welches eine Metallophosphatasedomäne mit höherer Sequenzhomologie aufweist und das durch Fehlen der Saponindomäne somit in der Domänenstruktur Tb927.4.1110 sehr ähnlich ist. Abb 25 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Domänen.

Als Zielsequenz der Interferenz wurden die Nukleotide 77 bis 652 ausgewählt, welche die Aminosäuren 7 bis 198 des prozessierten Proteins codieren, und mittels der Primer Sph\_HindIII\_U5 und Sph\_BamHI\_L5 amplifiziert. Nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*H I wurde das DNA-Fragment in den ebenso behandelten p2T7 ligiert. Nach zehn Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet<sub>K</sub>EG</sup> konnten zwei unabhängige Zelllinien erhalten werden. Nach Induktion durch Tetrazyklin nahm die Zelldichte nur wenig zu und blieb über etwa 30 h nahezu konstant (Abb. 22). Während dieser Zeit wiesen die Zellen



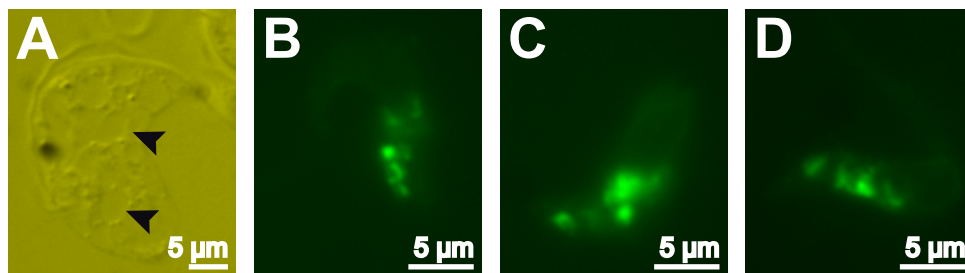
**Abb. 22: RNA-Interferenz gegen die saure Sphingomyelinase:** Wachstum von M1.2<sup>tet<sub>K</sub>EG</sup> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

sind neben denen der Saponin-domäne die niedrigsten E-Werte der Analyse. C) Auswahl des Genabschnittes für die RNA-Interferenz



in immer stärkeren Umfang eine unregelmäßige Morphologie auf und rundeten sich ab. Im Zellinnern waren mehrere Strukturen zu beobachten, deren Gestalt und Lichtbrechung in der Nomarski-Optik auf Liposomen hinweist (Abb. 23A).

EP1:GFP war ebenfalls stark delokalisiert in diesen Zellen. EP1:EGFP wies immer noch eine präferentielle Lokalisation zwischen Flagellartasche und Zellkern auf, zeigte allerdings eine diffusere Verteilung mit verschiedenen Punkten stärkerer Fluoreszenz (Abb. 23). Zwar beeinflusste die Störung der Lipidzusammensetzung die Lokalisation von EP1:EGFP, jedoch führte sie gleichzeitig zu einer starken Beeinträchtigung der zellulären Morphologie, die eine nähere Lokalisationsanalyse erschwerte.



**Abb. 23: Auswirkungen der RNA-Interferenz gegen die saure Sphingomyelinase:** A) Nach 30 h Induktion sind intrazelluläre Strukturen erkennbar, welche vermutlich Liposomen sind (Pfeile). B-D) Die Lokalisation von EP1:GFP ist in den betroffenen Zellen nicht signifikant vom experimentell unbeeinflussten Phänotyp unterscheidbar.

### 3.2. Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Reporterproteinen in monomorphen BSF

Der *knock down* von Proteinen in *T. brucei* beeinflusst nicht nur die Morphologie der Zellen, sondern meist auch den Wachstumsverlauf der jeweiligen Population. In solchen Fällen ermöglicht der Vergleich die Analyse unterschiedlicher Zelllinien mehrerer paralleler Transfektionen. Mithilfe von fluoreszierenden Markerproteine konnten Effekte auf den Proteintransport direkt durch Fluoreszenzmikroskopie festgestellt und dargestellt werden.

Im Folgenden wurden Proteine ausgewählt, die möglicherweise am Transport von GPI-verankerten Proteinen beteiligt sind, und nach RNA-Interferenz versucht, deren Rolle nachzuweisen. Um die Übersicht über die unterschiedlichen ausgewählten Proteine zu ermöglichen, gibt Abbildung 24 eine Übersicht über die in dieser Arbeit ausgewählten Proteinsequenzen und die vermutete Lokalisation der Proteine und ihrer Auswirkung. In den meisten Fällen wurde EP1:GFP als Reporter ausgewählt, da EP1:GFP im gesamten endosomalen Kompartiment lokalisiert ist und deshalb von den verwendeten Markerproteinen das breiteste Anwendungsgebiet aufweist.

#### 4.2.1. Der biosynthetische Transportweg von GPI-verankerten Proteinen

Die Proteine, die zum *knock down* ausgewählt wurden, können in zwei Kategorien eingeteilt werden: zunächst gibt es die biosynthetischen Interaktionspartner im ER und Golgi, welche vermutlich vornehmlich am Transport von neu synthetisierten Proteinen beteiligt sind. In diese Kategorie wurden alle Zielproteine zusammengefasst, die möglicherweise an dem direkten Transport von neu synthetisierten GPI-verankerten Proteinen an die Zelloberfläche beteiligt sind. Der Prozess des retrograden Transportes in das endoplasmatische Retikulum

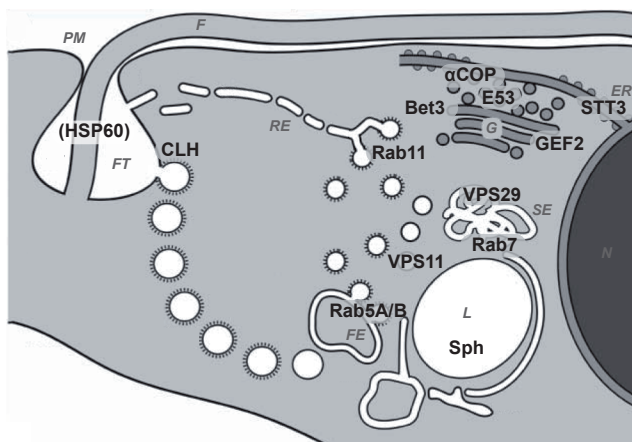


Abb. 24: Übersicht über die für die RNA-Interferenz ausgewählten Proteine und ihre vermutete Lokalisation in *T. brucei*.

A) Die ausgewählten Zielproteine können nach ihrem Wirkungsbereich in vornehmlich biosynthetische und vornehmlich recycelnde Interaktionspartner für das Trafficking von GPI-verankerten Proteinen eingeteilt werden. CCV: clathrinbedeckte Vesikel; CLH: *clathrin heavy chain*; ER: endoplasmatisches Retikulum; ERG53:

ERGIC-53; F: Flagellum; FE: frühe Endosomen; FT: Flagellartasche; G: Golgi-Apparat; GEF: Guanosyltauschfaktor; L: Lysosom; N: Nukleus; PM: Plasmamembran; Rab: *Ras gene from rat brain*; RE: recycelnde Endosomen; SE: späte Endosomen; Sph: Sphingomyelinase; STT: Staurosporin- und Temperatur-sensitives Protein; VPS: *vacular protein sorting*;

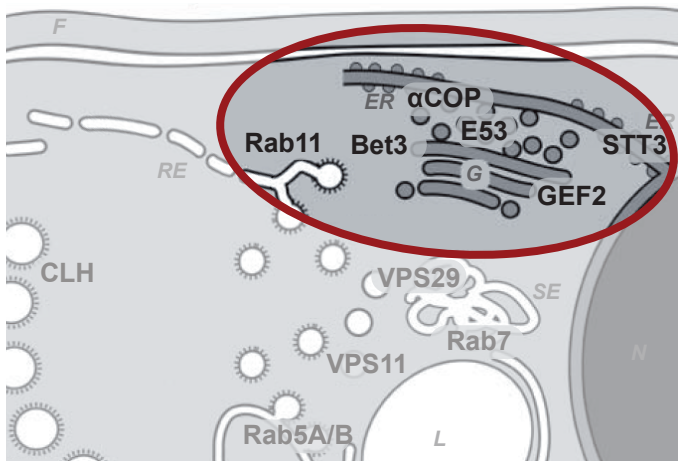


Abb. 25: Zielsequenzen von Regulatoren des biosynthetischen Transportweges

wurde bei dieser Einteilung vernachlässigt. Im darauffolgenden Kapitel wird auf Zielproteine eingegangen, die vornehmlich am Transport von endozytierten GPI-verankerten Proteinen beteiligt sind und so am Recycling der Markerproteine direkt beteiligt sind.

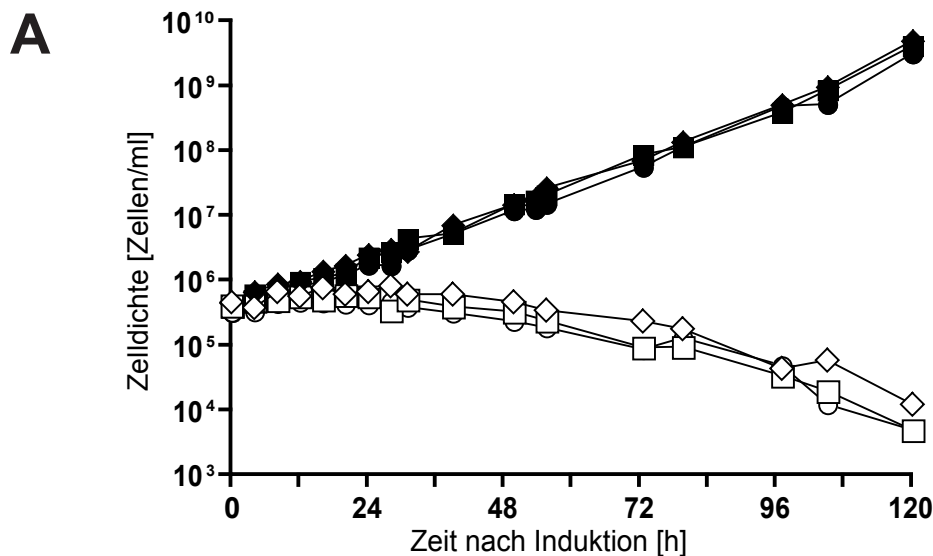
Zur näheren Charakterisierung des biosynthetischen Transportweges wurde der Transport durch COP I-Vesikel und durch COP II-Vesikel an unterschiedlichen Stellen unterbrochen. Zusätzlich wurde die Rolle von dem Lektin *Tb*ERGIC-53, von der TRAPP-Untereinheit *Tb*Bet3, der Oligosaccharyltransferase *Tb*STT3 und dem Nukleotidaustauschfaktor *Tb*GEF2 untersucht. Auch der Einfluß der kleinen GTPase *Tb*Rab11 auf den Transport von EP1:GFP wird in diesem Abschnitt erläutert. Abbildung 25 gibt eine Übersicht über die in diesem Kapitel herunterregulierten Interaktionsproteine.

#### 4.2.1.1. *Tb*ERGIC-53 ist nicht essentiell an dem Transport von EP1:GFP beteiligt

In Säugerzellen bindet ERGIC-53 als Mannose-bindendes Lektin N-Glycosylierte Proteine und vermittelt ihren Transport von ER zum Golgi-Apparat (Nyfeler *et al.*, 2006; Kamiya *et al.*, 2008). Die Interaktion von ERGIC-53 mit GPI-verankerten Proteinen ist bislang nicht untersucht worden (Hauri, persönliche Mitteilung).

Die Dichte von VSG ist im Golgi-Apparat 2,7-fach höher als im endoplasmatischen Retikulum (Grünfelder *et al.*, 2002). Die Sortierungsmechanismen, die zu dieser Aufkonzentrierung führen, sind allerdings noch vollständig unbekannt. Die Erkennung des GPI-Ankers wäre in Anbetracht der Variabilität in der Sequenz der VSGs eine mögliche Grundlage für eine mit der Aufkonzentrierung verbundenen Sortierung.

Die Nukleotide 196 bis 726 der codierenden Sequenz wurden mittels PCR amplifiziert und mit einer *Hind* III und einer *Bam* H I Schnittstelle versehen. Hierzu dienten die Primer ERGIC\_HindIII\_U1 und ERGIC\_BamHI\_L1. Nachfolgend wurde das PCR-Produkt in pBSK ligiert und sequenziert. Nach Bestätigung der Sequenz wurde das Segment wieder mit

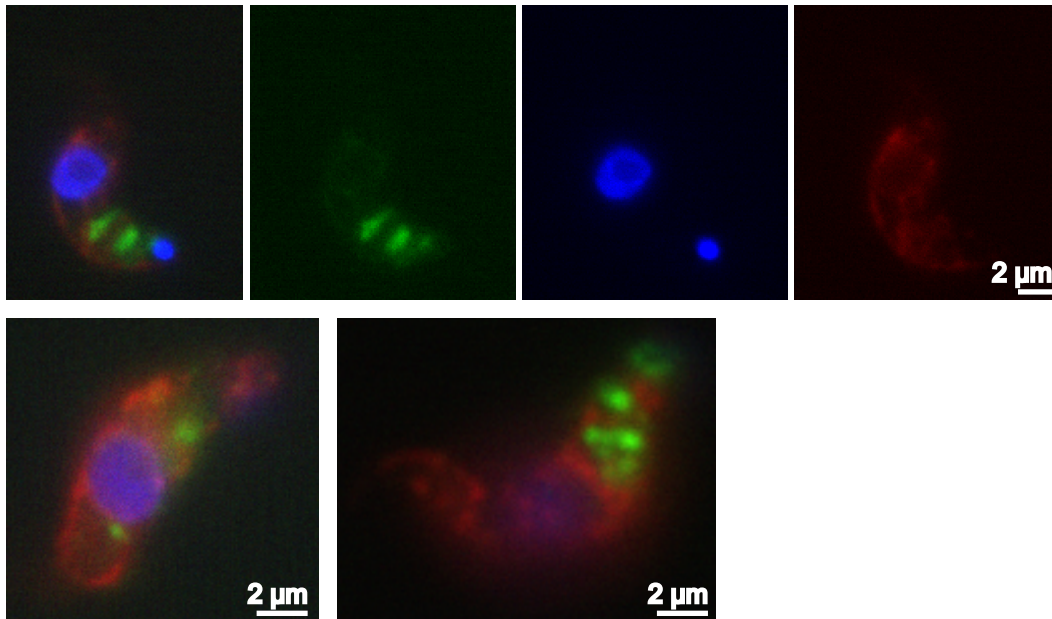


**Abb. 26: RNA-Interferenz gegen *TbERGIC-53*:** A) Wachstum von  $M1.2^{\text{tetR,ERGIC}}_{\text{K,EG}}$  nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

*Hind* III und *Bam*H I ausgeschnitten und mit einem ebenso behandelten p2T7 ligiert. Die verwendete Sequenz wies zwei stille Mutationen in den Nukleotiden 375 (T statt C) und 429 (A statt C) gegenüber der Sequenz Tb11.02.1680 auf. Das entstandene Plasmid wurde p2T7.ERGIC (R.ERGIC) genannt.

Nachfolgend wurde die Zelllinie  $M1.2^{\text{tet}}_{\text{K,EG}}$  in fünf Ansätzen mit dem entstandenen Vektor transfiziert. Zwei dieser Transfektionen wurden sofort nach Elektroporation in je zwei Mikrotiterplatten aliquotiert, während die weiteren drei Ansätze in 50 ml HMI9 kultiviert wurden. Insgesamt führten die Transfektionen zu acht klonalen und drei gemischten Populationen. Die Induktion der Kulturen über 20 h bewirkte bei sieben klonalen Zelllinien und allen drei Mischpopulationen ein stark verlangsamtes Wachstumsverhalten. Nach 120 h Induktion konnten keine lebenden Zellen in den induzierten Kulturen festgestellt werden, während die nicht-induzierten Kulturen ein konstantes Wachstum aufwiesen. Die Kulturen wiesen alle eine gegenüber der ursprünglichen Zelllinie  $M1.2^{\text{tet}}_{\text{K,EG}}$  um 2 h erhöhte Verdopplungszeit von 10 h auf. Zur mikroskopischen Analyse wurden drei unabhängige Zelllinien mit dem stärksten Effekt der RNAi auf das Populationswachstum ausgewählt, so dass eine der analysierten Zelllinien vermutlich eine Mischpopulation aus mehreren Klonen war.

Zunächst wurde die Auswirkung der Induktion auf das Wachstum der Population näher untersucht (Abb. 26). Die RNA-Interferenz gegen *TbERGIC-53* führte innerhalb von 8 h zu einem wahrnehmbaren Effekt auf die Zellzahl. Dies äußerte sich in einer nahezu konstant bleibenden Zelldichte der Population über 42 h. Nach etwa 50 h stirbt die Population allmählich ab.



**Abb. 27: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbERGIC-53*:** EP1:GFP wird trotz der Interferenz gegen *TbERGIC-53* vom ER in das endosomale Kompartiment transportiert. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: BiP (ER), Grün: EP1:GFP.

Um den Einfluss von *TbERGIC* auf den Transport von GPI-verankerten Proteinen zwischen ER und Golg-Apparat zu zeigen, wurden Zellen 16 h nach Induktion der Interferenz fixiert und das ER durch die Immunofluoreszenz gegen das ER-Protein BiP angefärbt (Abb. 27). Bei den untersuchten Zellen lässt sich die Fluoreszenz von EP1:GFP unverändert posterior zum ER feststellen. Selbst bei polynukleären Zellen ist zwar die Zytokinese beeinträchtigt, EP1:GFP allerdings nach wie vor zwischen Flagellartasche und ER nachweisbar.

#### **4.2.1.2. Die TRAPP-Untereinheit Bet3 ist essentiell und ist entscheidend für die Lokalisation von EP1:GFP im endosomalen System**

In Säugerzellen werden an den ER *exit sites* Proteine mithilfe von COP II-Untereinheiten in Vesikel sortiert und in Richtung ERGIC transportiert (Bonifacino und Glick 2004). Der COP II-vermittelte Transport ist der am besten charakterisierte Transportweg vom ER zum Golgi. Der *tethering* Komplex TRAPP spielt eine entscheidende Rolle bei dem Andocken von COP II-Vesikeln an die Membran des Golgi-Apparates in der Hefe (Cai *et al.*, 2007). Ausserdem fungiert der TRAPP I-Komplex als Guanosin-Austausch-Faktor für die kleine GTPase Rab1 (Miller 2007). In *S. cerevisiae* ist *in vitro* nachgewiesen worden, dass die COP II-Untereinheit Sec23 der Interaktionspartner für TRAPP I ist (Cai *et al.*, 2007). Somit bietet der *knock down* einer Komponente des TRAPP-Komplexes die Möglichkeit, spezifisch den COP II-abhängigen Transportweg zu unterbrechen und die Auswirkung auf die Lokalisation der GPI-verankerten Markerproteins zu untersuchen.

Der TRAPP I-Komplex besteht in *S. cerevisiae* aus sieben Untereinheiten, während der orthologe Komplex in *H. sapiens* die sechs Untereinheiten HsTRAPPc1-6 umfasst. Die

siebte Untereinheit Sctr65 besitzt kein bekanntes orthologes Protein in Säugerzellen. Die zusätzliche Anlagerung von drei weiteren Untereinheiten (trs85, trs120 und trs130) charakterisiert den TRAPP II-Komplex, der somit aus 10 Untereinheiten besteht. Von diesen drei Untereinheiten sind nur TRAPPc9 (trs120) und TRAPPc10 (trs130) in Säugerzellen bestimmt worden (Cox *et al.*, 2007).

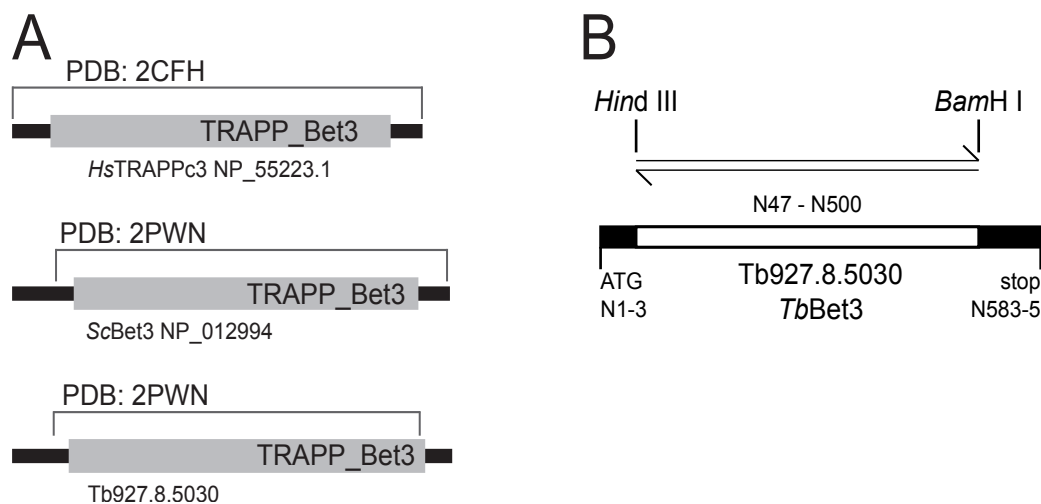
Zunächst wurde mithilfe der Sequenzen sämtlicher Untereinheiten des TRAPP-Komplexes aus der humanen Genomdatenbank die jeweiligen orthologen Gene in *T. brucei* durch BLAST-Suche ermittelt. Darüberhinaus wurde auch versucht, orthologe Proteine zu den Hefeuntereinheiten trs65 und trs85 zu finden.

Die BLAST-Analyse ergab, dass *Trypanosoma brucei* vermutlich nur über orthologe Proteine zu TRAPPc1/Bet5, TRAPPc2/trs20, TRAPPc3/Bet3, TRAPPc4/trs23 und TRAPPc5/trs31 verfügt (E-Werte zwischen  $2,4 \times 10^{-6}$  und  $3,6 \times 10^{-31}$ ). Die Analysen mit den verbliebenen Untereinheiten des TRAPP-Komplexes TRAPPc6 bis TRAPPc10 sowie dem Hefeprotein trs65 ergaben nur Sequenzen mit E-Werten zwischen 0,98 und 0,015. Diese Ergebnisse schließen eine Orthologie zwar nicht aus, hätten allerdings eine weitergehende Analyse notwendig gemacht. TRAPPc9 (trs120) und TRAPPc10 (trs130) sind unter Eukaryoten nur schwach konserviert, während trs65 nur in einigen Fungi konserviert ist und trs85 ebenfalls kein Ortholog in Säugerzellen aufweist (Cox *et al.*, 2007). Die Untereinheit TRAPPc6 (trs33) hingegen wurde sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen nachgewiesen, ist allerdings in *Saccharomyces cerevisiae* nicht essentiell.

Von den Zuordnungen der anderen fünf TRAPP-Untereinheiten ist die von TRAPPc3/Bet3 (NP\_055223.1) zu der Sequenz Tb927.8.5030 mit einem E-Wert von  $3,6 \times 10^{-31}$  die sicherste. Eine SMART-Analyse beider Sequenzen ergab eine Bet3-Domäne zwischen den Aminosäuren 18 und 168 (*H. sapiens*) beziehungsweise den Aminosäuren 26 und 180 (*T. brucei*). Im Vergleich dazu umfasst die Bet3-Domäne von ScBet3 aus *S. cerevisiae* die Aminosäuren 29 bis 181 (Abb. 28). Das Alignment zwischen ScBet3p, HsTRAPPc3 und Tb927.8.5030 bestätigte Tb927.8.5030 als TbBet3 und zeigte, dass HsTRAPPc3 12 AS kürzer ist als die orthologen Sequenzen von ScBet3 und TbBet3. Gleichzeitig zeigt es aber auch, dass sowohl die gesamte Sequenz als auch die Bet3-Domäne allein zwischen den drei Proteinen stark konserviert sind (38% Identität innerhalb der Domänen gegenüber 35% Identität des Gesamtproteins). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde TbBet3 als Zielsequenz für RNAi ausgesucht. Mittlerweile wurde diese Zuordnung durch die Annotierung als vermutliches Bet3 in der Datenbank bestärkt.

Das Segment von Nukleotid 47 bis Nukleotid 500 beinhaltet den größten Teil des offenen Leserahmens von TbBet3 (582 Nukleotide). Es wurde vor allem wegen der beiden spezifischen Sequenzmotive, die sowohl in Hefe als auch im Säugersystem vorkommen (Sacher *et al.*, 2000), zur Durchführung der RNAi ausgewählt. Mittels der Software Oligo4 wurden die Primer Bet3\_BamHI\_U1 und Bet3\_HindIII\_L1 entworfen und durch eingefügte Hind III-





**Abb. 28: In silico-Identifizierung von TbBet3:** A) Vergleichende SMART-Analyse mit den Sequenzen von TRAPPC3 aus *H. sapiens* (NP\_55223.1) und Bet3 aus *S. cerevisiae* (NP\_012994). Darüberhinaus wurde die laut BLAST-Analyse orthologe Sequenz Tb927.8.5030 dargestellt. Die bet3-Domänen stellen die einzige Übereinstimmung und Domänen dar, die nach SMART bestimmbar sind. Darüberhinaus sind die Domänen 2CFH bzw. 2PWN grau eingezeichnet. B) Übersicht über die Auswahl des zur RNA-Interferenz amplifizierten Genfragmentes.

und *BamH I*-Schnittstellen in den Vektor für RNAi gebracht. Nach Subklonierung in pBSK wurde die Sequenz mit 100% Identität bestätigt und der Vektor p2T7.Bet3 zur Transfektion der Zelllinien M1.2<sup>tet</sup><sub>K,EG</sub> genutzt.

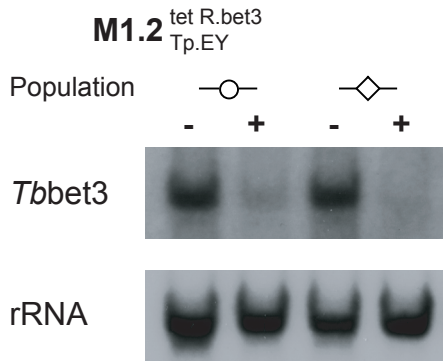
Zehn Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K,EG</sub> führten zu insgesamt sieben Populationen, von denen drei nach Induktion durch Tetrazyklin abstarben. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit, dass die Populationen nicht klonal waren, wurde der Vektor noch einmal in die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>Tp,EY</sub> transfiziert. Drei Elektroporationen führten nach Selektion mit Phleomycin zu insgesamt sieben klonalen Zelllinien. Die Induktion der Interferenz durch Tetrazyklin hatte innerhalb der ersten 12 h einen deutlichen Effekt auf die Teilungsrate der Zellen.

Zwei Zelllinien aus unterschiedlichen Transfektionen wurden aufgrund des deutlichen Effektes von Tetrazyklin zur weiteren Analyse ausgewählt. Der *knock down* der TbBet3-mRNA in zwei unabhängigen Zelllinien wurde durch Northern Blot von Gesamt-RNA und anschließender Hybridisierung mit der Zielsequenz der RNA-Interferenz nachgewiesen (Abb. 29A). Obwohl die Kontrollhybridisierung mit einer rRNA-Sonde eine gewisse Schwankung betreffend der Menge der intakten mRNA zeigte, war die Abnahme von TbBet3-mRNA deutlich zu erkennen.

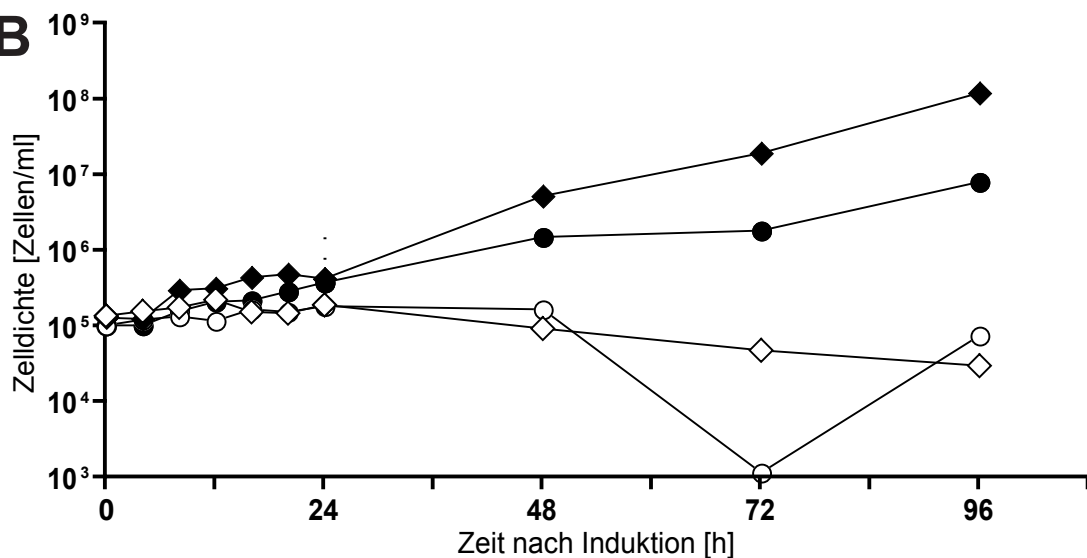
Das Wachstumsverhalten der Zelllinien nach Induktion der RNAi wurde genauer beobachtet (Abb. 29B). Die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>Tp,EY</sub> R.Bet3 #1.11 wies nach Tetrazyklingabe kein Populationswachstum mehr auf. Allerdings deutet die hohe Verdopplungszeit (~12 h) der Kontrollkultur auf unvollständige Repression in Abwesenheit von Tetrazyklin hin. Die



**A**



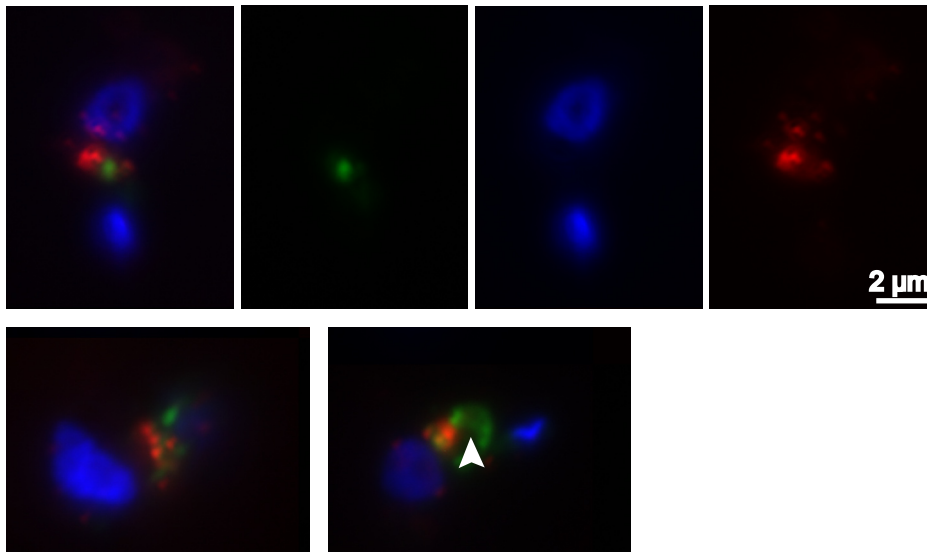
**B**



**Abb. 29: RNA-Interferenz gegen *Tbbet3*:** A) Hybridisierung der mRNA von *bet3*, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tet R.Bet3</sup><sub>Tp.EY</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

Zelllinie M1.2<sup>tet R.Bet3</sup><sub>Tp.EY</sub> #III.5 wies uninduziert eine Verdopplungszeit von 9 h auf, was auf eine geringere *leaky transcription* als bei der Zelllinie M1.2<sup>tet R.Bet3</sup><sub>Tp.EY</sub> #I.11 hindeutet.

Nach Fixierung wurde die Lokalisation von EP1:GFP in den induzierten Zellen untersucht. Abbildung 30 zeigt beispielhaft die Lokalisation von EP1:GFP nach 17,5 h Induktion durch Tetrazyklin. Zur näheren Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurde der Golgi-Apparat mit Antikörpern gegen die GTPase *TbRab31* angefärbt. EP1:GFP wird in einem konkreten Punkt der Zellen konzentriert, der zwischen der Flagellartasche und dem Golgi-Apparat lokalisiert ist. Eine Überschneidung von der EP1:GFP-positiven Struktur mit dem Golgi-Apparat konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 30: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbBet3*:** EP1:GFP akkumuliert bei Interferenz gegen *TbBet3* nahe dem Golgi. Der Pfeil bezeichnet die vermutete Position des Lysosoms, welche durch die Akkumulation von EP1:GFP deutlich wird. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: *TbRab31*(Golgi), Grün: EP1:GFP.

#### 4.2.1.3. Die Depletion einer COP I-Untereinheit führt zur Delokalisation von EP1:GFP

Der Transport des GPI-verankerten Proteins Gas1p zum Golgi-Apparat hängt in der Hefe sowohl von COP II wie von COP I ab (Sütterlin *et al.*, 1997), während der Transport eines löslichen Proteins unter gleichen Bedingungen nicht beeinträchtigt war. Außerdem konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass bei Austritt aus dem ER die GPI-verankerte Glucosyltransferase Gas1p in andere Vesikel als das Transmembranprotein Gap1p sortiert wird (Muñiz *et al.*, 2000; Morsomme *et al.*, 2003). Über die Strukturproteine dieser Vesikel ist allerdings nichts bekannt.

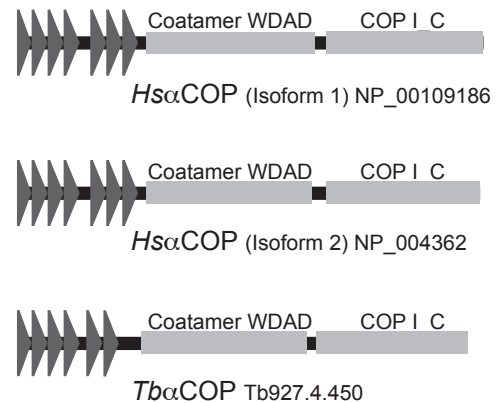
Um die Rolle von COP I-Vesikeln beim Transport von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei* nachzuweisen, wurde eine Untereinheit des COP I-Komplexes mittels RNAi ausgeschaltet. Die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ -COP bilden bereits im Zytosol einen Komplex (Waters *et al.*, 1991) und bieten sich somit für eine vollständige Ausschaltung des gesamten COP I-Komplexes an.

Die BLAST-Analyse mit den vier humanen Untereinheiten (NP\_001091868, NP\_057535, NP\_057212 und NP\_001646) führte zu den orthologen Sequenzen von *T. brucei*. Von den vier möglichen Zielsequenzen wurde Tb927.4.450 mit dem niedrigsten E-Wert ( $9,4 \times 10^{-156}$ ) ausgewählt. Mittels SMART-Analyse wurde ein Vergleich der Domänenstruktur der beiden humanen Isoformen von  $\alpha$ COP (NP\_001091868 und NP\_004362) mit den Ergebnissen für Tb927.4.450 durchgeführt (Abb. 31). Der Vergleich zeigte eine deutliche Übereinstimmung. Alle drei Proteinsequenzen weisen zunächst sechs  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen (WD40) mit ähnlichen E-Werten ( $10^{-6}$  bis  $10^{-11}$ ) auf.

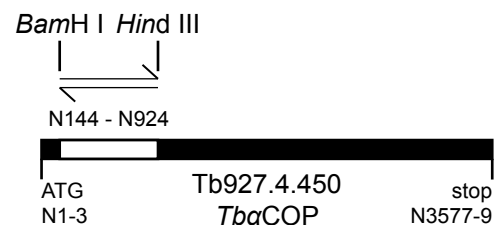
A

Sequenz-ID	Annotation	E-Wert
Tb927.4.450	coatamer alpha subunit	$9,9 \times 10^{-137}$
Tb927.2.6050	beta prime COP	$2,4 \times 10^{-46}$
Tb927.8.4210	hypothetical protein, conserved	$5,2 \times 10^{-27}$
Tb927.7.4700	hypothetical protein, conserved	$2,6 \times 10^{-20}$
Tb10.70.1660	intraflagellar transport protein IFT122	$5,7 \times 10^{-20}$
Tb10.6k15.0110	hypothetical protein protein	$1,3 \times 10^{-19}$
Tb927.8.5990	hypothetical protein, conserved	$2,7 \times 10^{-19}$
Tb10.61.2920	flagellar protein PF20	$7,0 \times 10^{-19}$
Tb09.211.1500	katanin, putative	$8,8 \times 10^{-18}$
Tb927.6.1830	hypothetical protein, conserved	$1,5 \times 10^{-17}$

B



C



**Abb. 31 *In silico*-Identifizierung von *TbαCOP*:** A) Ergebnisse der BLAST-Suche aufgrund der Sequenz NP\_00109186. B) Vergleich der Domänenarchitektur zwischen den beiden humanen Isoformen von  $\alpha$ COP (NP\_00109186) und (NP\_004362) und dem orthologen Protein aus *T. brucei* (Tb927.4.450). Bis auf wenige Aminosäuren stimmt die Domänenarchitektur der drei Sequenzen überein. Die drei unterschiedlichen Strukturen sind  $\beta$ -Transducin Wiederholungen (WD40, SMART SM00320, durch Dreiecke symbolisiert), WD-assoziierte Domäne (PFAM 04053) und die C-terminale Domäne COP-C (PFAM PF06957). C) Auswahl des DNA-Fragmentes zur RNA-Interferenz. Die korrespondierenden Proteinsequenzen mit den dazugehörigen Domänen aus Abbildung 34 B sind bei der Entsprechung der codierenden Triplets mit der Aminosäuresequenz im selben Maßstab aufgetragen.

Die humanen Proteine besitzen außerdem noch eine siebte WD40-Domäne, deren Signifikanz aufgrund der hohen E-Werte von  $1,38 \times 10^{-1}$  bezweifelt werden kann. Die beiden C-terminalen Domänen "WD-assoziierte Domäne" (WDAD) und "COP I-C-terminale Domäne" (COP I\_C) werden in allen drei Sequenzen mit sehr niedrigen E-Werten von  $1,2 \times 10^{-54}$  bzw.  $2,2 \times 10^{-50}$  angegeben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Tb927.4.450 als *TbαCOP* identifiziert.

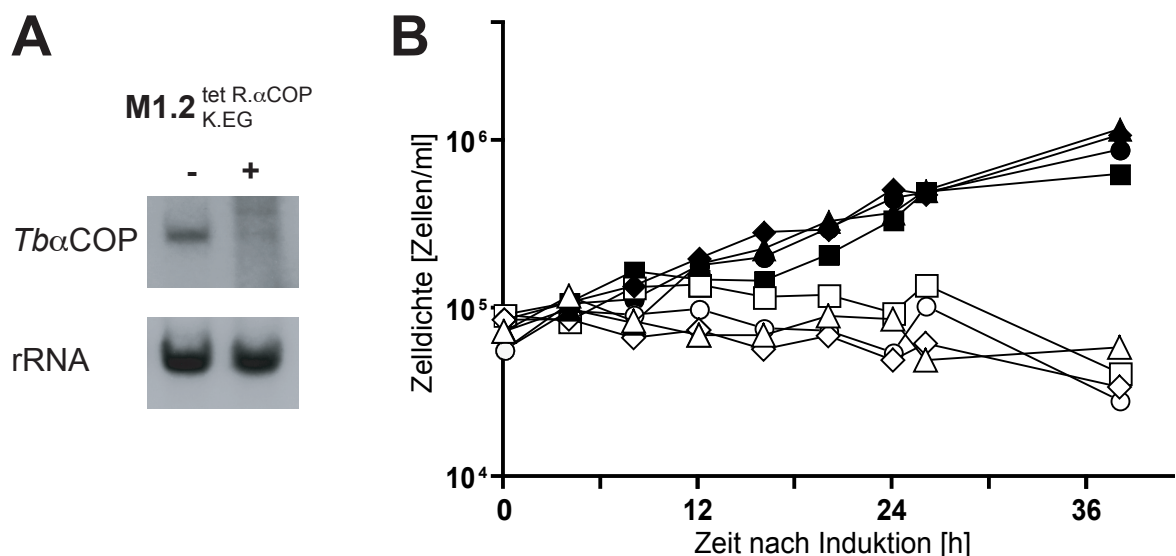
Die Primer aCOP\_HindIII\_U1 und aCOP\_BamHI\_L1 für die Klonierung wurden so mithilfe des Programms OLIGO4 entworfen, dass sie die Schnittstellen *BamH I* und *Hind III* beinhalten und die Nukleotide 144 bis 1888 des offenen Leserahmens amplifizieren. Der Restriktionsverdau mit *Hind III* ergab, dass eine weitere, interne Schnittstelle von *Hind III* beim Nukleotid 924 vorlag. Aus diesem Grund wurden beide Abschnitte mithilfe der Restriktionsenzyme *Hind III* bzw. *Hind III* und *BamH I* mit pBSK ligiert. Beide hergestellten

Plasmide wurden sequenziert und anschließend das N-terminale 720 bp-Fragment als Zielsequenz für die RNAi ausgewählt. Die Sequenzen von TREU927 und AnTat1.1 in dem Fragment stimmen bis auf fünf stille Mutationen und zwei Punktmutationen (R118L und S226G) überein. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Xba* I ausgeschnitten und in den ebenso behandelten p2T7 kloniert.

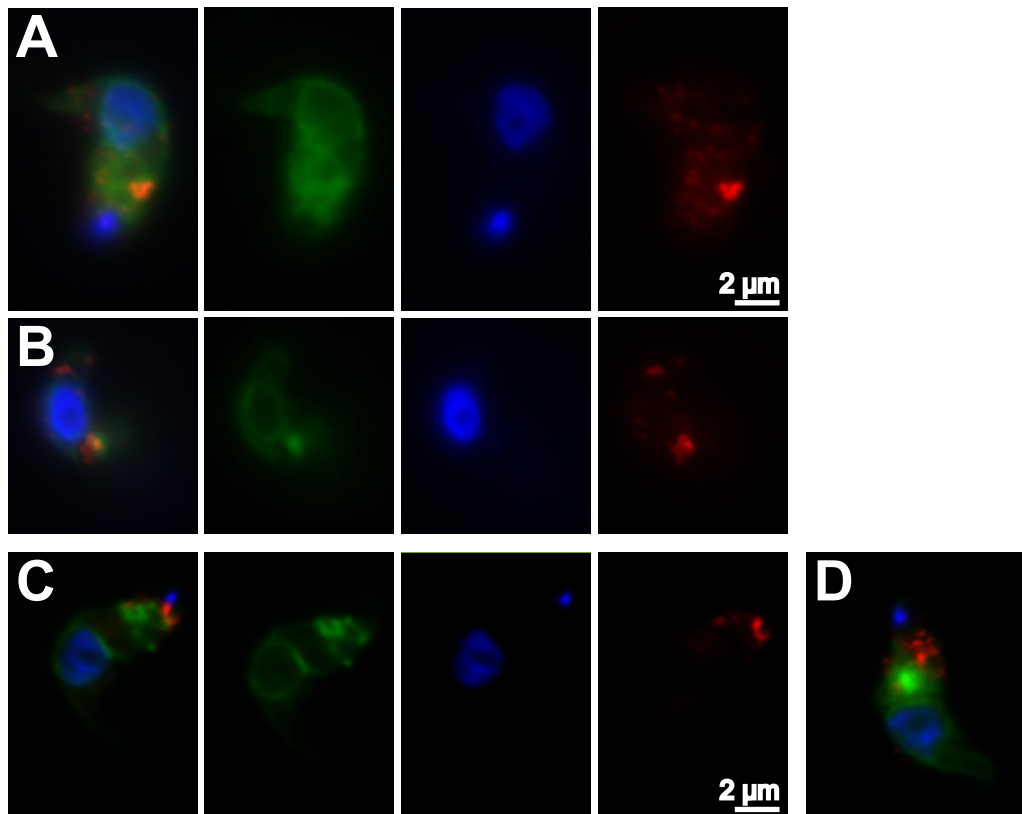
Die Zelllinie M1.2<sup>tet<sub>K.EG</sub></sup> wurde mit dem linearisierten Vektor p2T7.aCOP720 transfiziert. Neun von zehn Transfektionen führten zu überlebenden Populationen. Alle neun Transfektanten reagierten mit deutlich erhöhter Verdopplungszeit auf Tetrazyklin. Nach der Induktion wurden die Zellen zunehmend unförmiger und verloren schließlich ihre langgestreckte Form. Durch die Abrundung wurde die Bewegung der Zellen zunehmend ungerichteter. Das Schlagen des Flagellums erlaubte die Unterscheidung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen. Nach 48 h gab nur noch wenige Zellen mit schlagendem Flagellum, während nach 72 h keine Anzeichen für lebende Zellen festgestellt werden konnten.

Nach wiederholter Transfektion wurde die Zellen sofort auf Mikrotiterplatten aliquotiert. Allerdings zeigten nur ein Teil dieser klonalen Zelllinien die beobachtete Veränderung in Morphologie und Beeinträchtigung des Populationswachstums.

Um die RNA-Interferenz zu überprüfen wurde exemplarisch nach 8 h Induktion Gesamt-RNA einer Zelllinie isoliert und durch Hybridisierung mit dem Gen-Fragment, gegen welches die RNA-Interferenz gerichtet ist, die Menge an  $\alpha$ COP-mRNA nachgewiesen (Abb. 32A). Nach Exposition wurde der Blot zur Kontrolle mit einer rRNA-Sonde hybridisiert. Die Induktion der RNA-Interferenz führt zu einer starken Reduktion der *TbaCOP*-mRNA im Vergleich zu der etwa gleichstarken rRNA-Bande.



**Abb. 32: RNA-Interferenz gegen  $\alpha$ COP:** A) Hybridisierung der mRNA von  $\alpha$ COP, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tetR. $\alpha$ COP K.EG</sup> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.



**Abb. 33: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbαCOP*:** A-B) EP1:GFP akkumuliert bei Interferenz gegen *TbαCOP* im ER. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: *TbRab31* (Golgi-Apparat), Grün: EP1:GFP. C) Das Transmembranprotein *TbMBAP* ist von dieser Retention nicht betroffen. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: *TbRab31* (Golgi-Apparat), Grün: *TbMBAP*.

Abbildung 32B zeigt das Wachstum von vier ausgewählten Zelllinien dieser Transfektion. Alle vier Zelllinien wiesen eine Verdopplungszeit von 9-11 h auf. Die Ursprungszelllinie M1.2<sub>K,EG</sub><sup>tet</sup> weist eine Verdopplungszeit von ~8 h auf. Dies legt den Schluss nahe, dass in den analysierten Zellen nur eine unvollständige Repression der *T7*-Operatoren stattfindet.

Die induzierten Kulturen zeigten jedoch eine noch weit stärkere Reaktion auf die Induktion durch Tetrazyklin. Bereits nach 4 h wiesen die Populationen kein Wachstum mehr auf und begannen langsam abzusterben. Nach 36 h wurde die Analyse abgebrochen, da sämtliche Zellen eine starke Deformation aufwiesen.

Der *knock down* der αCOP-mRNA führte zu einer deutlichen Delokalisation von EP1:GFP. Abbildung 33 zeigt Zellen nach einer Induktionszeit von 18 h. EP1:GFP zeigt eine deutliche Delokalisation von EP1:GFP über die gesamte Länge der Zelle, welche aber nicht zytoplasmatisch ist. Die Lokalisation im anterioren Teil der Zelle sowie das deutlich sichtbare perinukleäre ER deuten stark auf eine Lokalisation im ER hin. Die starke Lokalisation von EP1:GFP in Endosomen war hingegen nicht mehr nachweisbar. Die Anfärbung des Golgi-Apparates legt nahe, dass EP1:GFP nicht mehr den Golgi-Apparat passieren kann und es deshalb zu einer Akkumulation des Proteins im ER kommt. Eine Gegenfärbung mit der endosomalen membrangebundenen sauren Phosphatase *TbMBAP* (Engstler *et al.*,

2005a) zeigte, dass EP1:GFP nach Induktion der RNA-Interferenz keine nennenswerte Colokalisation mit der sauren Phosphatase aufwies. Die Halbwertszeit der *TbMBAP* liegt bei etwa 9,5 h (basierend auf K. Bopp, Diplomarbeit), unter der Voraussetzung, dass die Repression durch die RNAi-Induktion vollständig die Neusynthese blockiert. Da die absolute Repression kaum erreicht wird würde dies eine noch niedrigere Halbwertszeit für *TbMBAP* bedeuten. Im Vergleich hierzu liegt die Halbwertszeit von EP1:GFP bei etwa 3,5 h (Engstler und Boshart 2004). Demzufolge dürfte nach 18 h Induktion <5% des ursprünglichen EP1:GFP vorliegen. Die beobachtete Akkumulation aus EP1:GFP im ER besteht also vor allem aus Proteinen, welche nach Induktion der RNA-Interferenz synthetisiert wurden und zeigt so die Abhängigkeit des Traffickings von GPI-verankerten Proteinen von  $\alpha$ COP im biosynthetischen, nicht jedoch im *recycling* Transportweg.

#### 4.2.1.4. Der Transport von EP1:GFP in die Flagellartasche ist von *TbRab11* abhängig

In Säugerzellen ist Rab11 nicht nur an dem Transport des Transferrinrezeptors zur Plasmamembran (Zhang *et al.*, 2004), sondern auch am Sortierungsprozess von apikalen und basolateralen Proteinen (Wang *et al.*, 2000b) beteiligt. Außerdem reguliert es den Transport von Proteinen vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran (Chen *et al.*, 1998). In *Trypanosoma brucei* dekoriert *TbRab11* die exozytischen Carrier (EXC), die die einzigen elektronenmikroskopisch nachgewiesenen exozytierenden Vesikel darstellen (Grünfelder *et al.*, 2003). Um den Einfluss von Rab11 auf die Lokalisation von EP1:GFP näher zu untersuchen, wurde die Neusynthese von *TbRab11* durch RNAi verhindert. *TbRab11* (Tb927.8.4330) ist bereits charakterisiert worden (Jeffries *et al.*, 2001).

Aufgrund der hohen Konservierung der Rab-Domäne wurde zusätzlich die 5'-UTR zum Entwurf geeigneter Primer herangezogen (Abb. 34). Nach Analyse der geeigneten Annealing-Stellen in der 5'-UTR und dem offenen Leseraster wurden die Primer Rab11\_HindIII\_U1 und Rab11\_BamHI\_L1 so entworfen, dass das amplifizierte Fragment die letzten 135 Nukleotide der 5'-UTR sowie die ersten 451 Nukleotide des offenen Leserasters umfasst. Das gewonnene PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Hind* III und *Bam*H I geschnitten und in das ebenso geschnittene Plasmid pBSK kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz wurde der Abschnitt nach Restriktion mit *Hind* III und *Bam*H I mit dem ebenso geschnittenen Plasmid p2T7

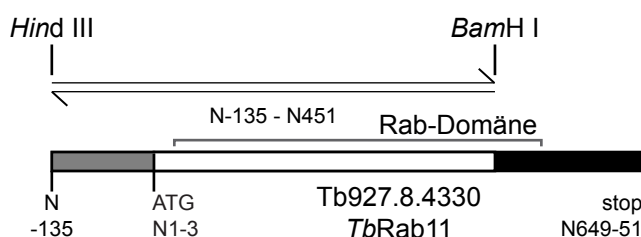
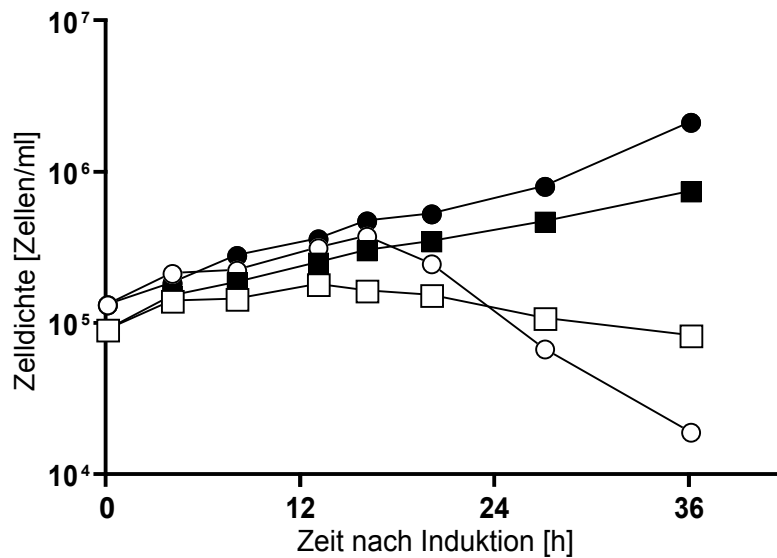


Abb. 34: Position des für die RNA-Interferenz ausgewählten Fragmentes im *Rab11*-Gen.



**Abb. 35: RNA-Interferenz gegen *TbRab11*:** A) Wachstum von M1.2<sup>tetR, Rab11</sup><sub>K,EG</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

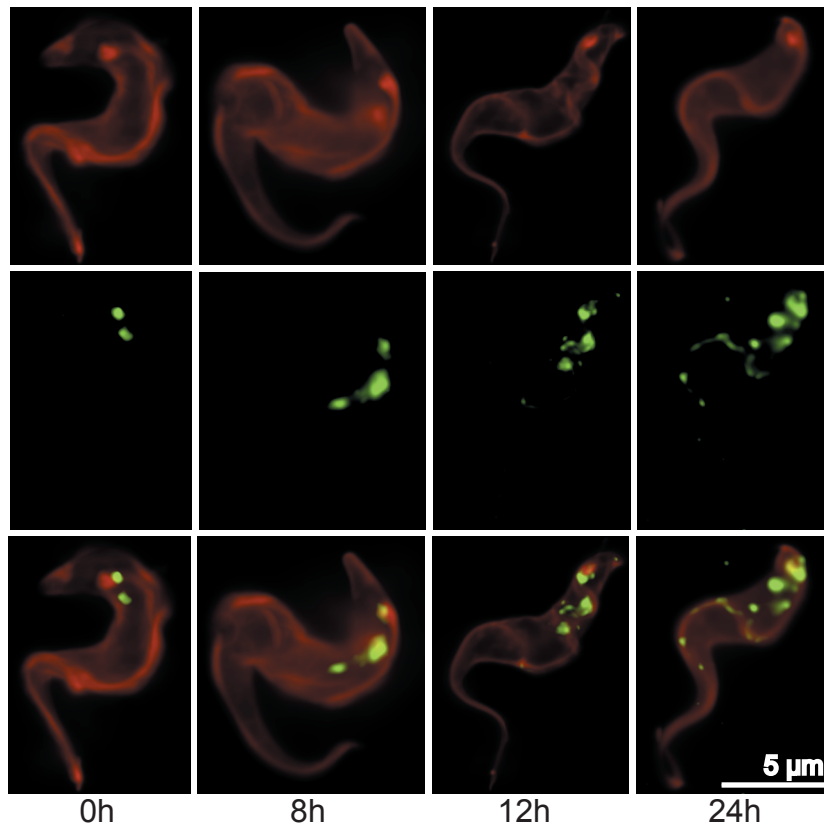
ligiert. Der Vergleich der Sequenz von AnTat1.1 mit der Sequenz von TREU927 ergab zwei stille Mutationen (c146t und t329c) und zwei Punktmutationen (c130t und ag148-9ga respektive F44S und R50K).

Als Zelllinie wurde zunächst M1.2<sup>tet</sup><sub>K,EG</sub> ausgewählt. Vier von fünf Transfektionen führten zu rekombinanten Zellen. Die Transfektion wurde mit gleicher Effizienz mit der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K,EG Tb, VY</sub> wiederholt, da sie durch die Oberflächenfluoreszenz von VSG'Y' die Analyse der lebenden, induzierten Zellen vereinfacht. Auch hier lag die Transfektionseffizienz bei 80% in insgesamt zehn Transfektionen.

Die resultierenden Zelllinien wiesen eine Verdopplungszeit zwischen 9 und 12 h auf. Nach Induktion mit Tetrazyklin zeigten beide ausgewählte Populationen eine deutlich verringerte Teilungsrate. In einer der beiden Populationen blieb die Zelldichte nach 4 h nahezu konstant und sank dann nach 24 h Induktionsdauer leicht ab. Die zweite Population zeigte die ersten 18 h keine deutliche Reaktion auf die Tetrazyklinzugabe. Nach etwa 18 h sank die Anzahl der lebenden Zellen jedoch deutlich ab (Abb. 35).

Bereits 5 h nach Induktion der RNA-Interferenz zeigte sich eine verstärkte Lokalisation von EP1:GFP nahe der Flagellartasche, während das Signal anterior zur Flagellartasche schwächer wurde. Da sich die frühen Endosomen nahe der Flagellartasche befinden, wurde dieses Kompartiment während des Verlaufs der Interferenz betrachtet. Die Gegenfärbung mit  $\alpha$ -Rab5A zeigt, dass im Verlauf der RNA-Interferenz die Größe der frühen Endosomen deutlich zunimmt. Nach 24 h Induktion ist Rab5A sehr nahe an der Flagellartasche nachweisbar, so dass es teilweise zu einer Colokalisation zwischen Rab5A und Oberflächen-VSG kommt. Diese Zunahme von Anzahl und Volumen der frühendosomalen Vesikel zeigt, dass der Transport des Membranmaterial zu dem *recycling* endosomalen Kompartiment von Rab11





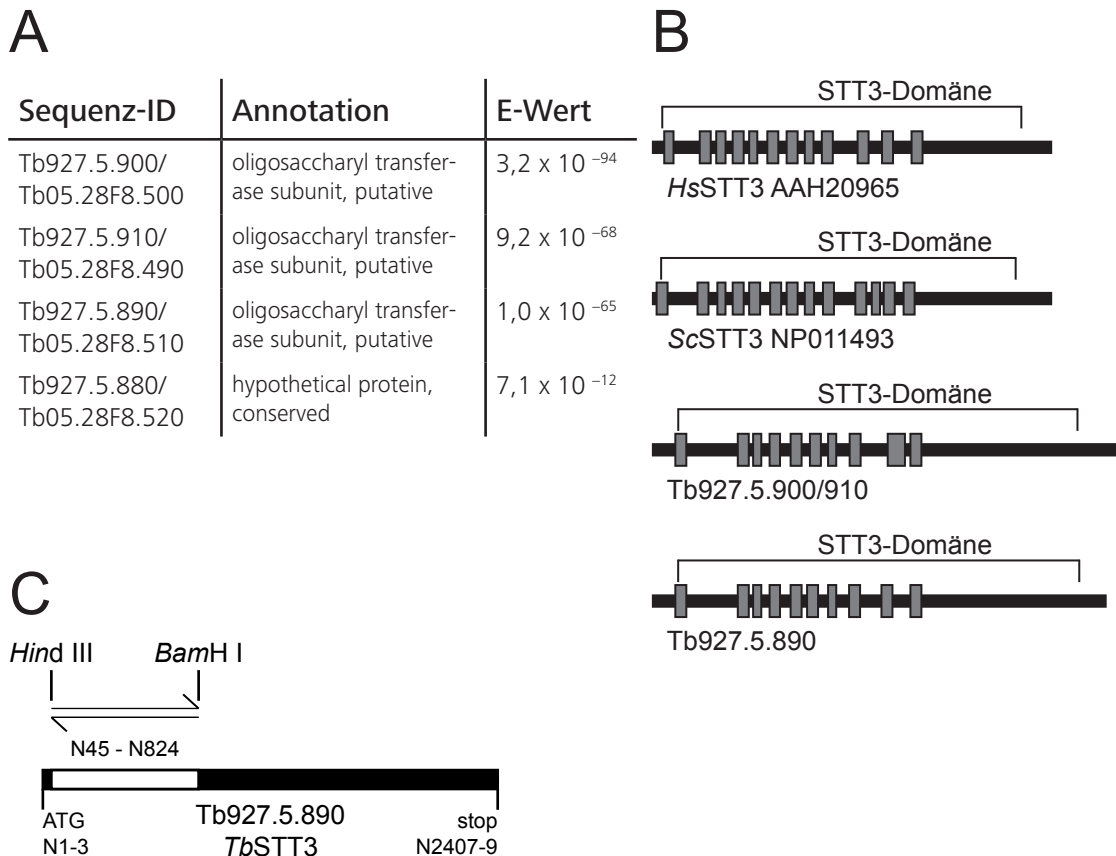
**Abb. 36: Zunahme des Rab5-Positiven Kompartimentes nach RNA-Interferenz gegen *TbRab11*:** Während der Interferenz gegen *TbRab11* kommt es nach 8h zu einer 2,8fachen Vergrößerung des Rab5-positiven Kompartimentes. Rab5 konzentriert sich hierbei nicht mehr auf einige wenige Strukturen, sondern weist eine verstreutere Lokalisation auf. Rot: AMCA-Sulfo-NHS (VSG), Grün: *TbRab5A*.

abhängt. Bei Endozytose sammelt sich Transferrin nach knock down von Rab11 nahe dem Lysosom vermutlich in den späten Endosomen an (Overath und Engstler, 2004). Vermutlich sind also die Transportwege direkt aus den frühen Endosomen sowie mittelbar über die späten Endosomen von Rab11 abhängig.

#### 4.2.1.5. N-Glycane sind essentiell für die Sortierung in der Flagellartasche

N-Glycosylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Prozessierung und der Kontrolle der korrekten Faltung von Proteinen. Diese Qualitätskontrolle setzt unmittelbar kotranslational mit der *en bloc*-Übertragung des Oligosaccharids durch den Oligosaccharyl-Transferase-Komplex ein (Chavan und Lennarz 2006). Zudem sind N-Glycosylierungen eine gemeinsame Struktur von GPI-verankerten Proteinen und somit ein mögliches Sortierungsmerkmal. Um die Rolle der N-Glycosylierungen bei der Sortierung von GPI-verankerten Proteinen darzustellen ist der *knock down* der Transferase ein geeigneter Schritt.

In der Hefe besteht dieser Proteinkomplex aus neun Untereinheiten, von denen vier essentiell sind. Das katalytische Zentrum liegt vermutlich in der Untereinheit STT3 (Nilsson *et al.*, 2003). Als einzige Untereinheit des Oligosaccharyltransferase-Komplexes konnte STT3 aus



**Abb. 37: *In silico*-Identifizierung von *TbSTT3*.** A) Ergebnisse der BLAST-Suche. B) Vergleich der Domänenstruktur der Saccharyl-Transferase Untereinheit 3 von *H. sapiens* und *S. cerevisiae* mit den Strukturen der vier möglichen orthologen Proteine aus *T. brucei*. Die einzelnen vermuteten Transmembrandomänen sind als Rechtecke gekennzeichnet. C) Übersicht über das zur Amplifikation ausgewählte Gen-Fragment.

*L. major* identifiziert werden (Hese *et al.*, 2008). Allerdings weist *LmSTT3p* eine breitere Substratspezifität auf und überträgt eine Vielzahl von Oligosacchariden, die sich in Anzahl der Mannosen unterscheiden können. Die zusätzliche Expression der anderen, in der Hefe essentiellen Untereinheiten beeinflusste deutlich die Spezifität der Transferase.

Zur Verhinderung der N-Glycosylierung neu synthetisierter Proteine wurde die Untereinheit STT3 der Oligosaccharyl-Transferase als Zielsequenz für die RNA-Interferenz ausgewählt, da die Überprüfung der anderen acht Untereinheiten des Oligosaccharyl-Transferase-Komplexes aus *S. cerevisiae* keine eindeutigen orthologen Sequenzen ergab und nur die Suche nach Ost1 und Ost2 zu Sequenzen führte, die uncharakterisierte Proteine ähnlicher Größe wie der orthologen Proteine der Hefe codieren.

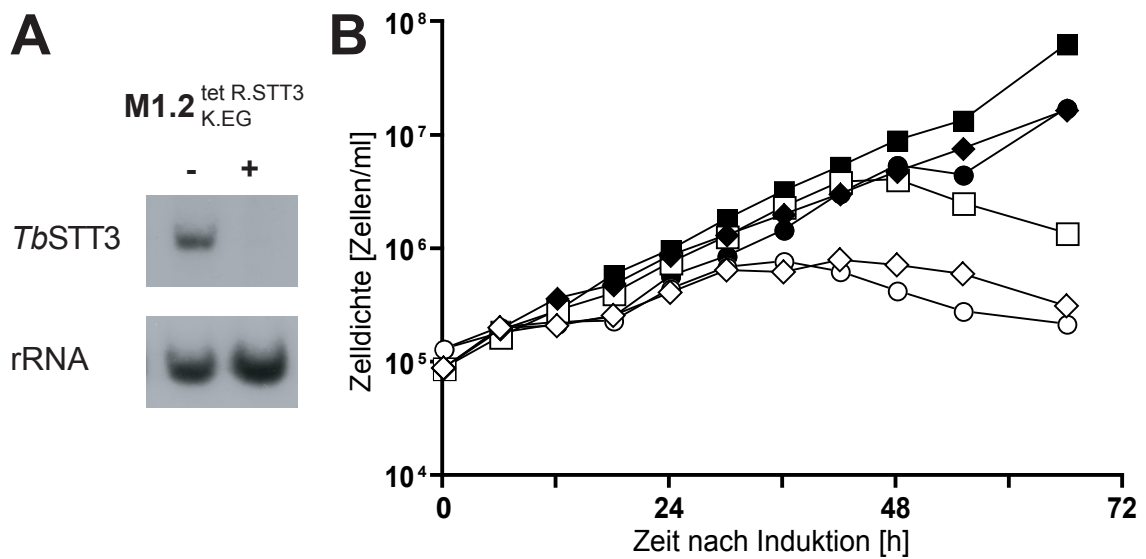
Das Ortholog der STT3 in *T. brucei* wurde durch BLAST-Suche mit der Sequenz NP\_011493 von *S. cerevisiae* ermittelt (Abb. 37). Die BLAST-Analyse führte zu mehreren möglichen Sequenzen, wobei den drei wahrscheinlichsten Sequenzen E-Werte zwischen  $1,0 \times 10^{-65}$  und  $3,2 \times 10^{-94}$  zugeordnet wurden. Die vier Gene mit den höchsten Wahrscheinlichkeitswerten liegen direkt hintereinander auf Chromosom 5 von *T. brucei* (Tb927.5.880 bis Tb927.5.910).

Mit Ausnahme von Tb927.5.880 mit einer Länge von 270 Nukleotiden weisen die anderen drei codierenden Sequenzen nicht nur eine ähnliche Länge (2406 bzw. 2466 bp), sondern auch eine hohe Sequenzidentität auf (zwischen 85 und 96%). Vermutlich ist dieses Cluster durch Genverdopplung entstanden, wobei bei dem vierten Gen nicht das vollständige offene Leseraster dupliziert wurde.

Die SMART-Analyse aller vier Gene zeigt die STT3-Domäne in allen Proteinen mit Ausnahme von Tb927.5.880 hin. Gleichzeitig wird eine Transmembrandomäne vorhergesagt, die sich mit dem Signalpeptid überschneidet und die nahe dem N-Terminus der STT3-Domäne liegt. Allerdings beinhaltet die STT3-Domäne der drei Proteine nur 9 Transmembrandomänen, während für die humane Sequenz 11 Transmembrandomänen vorhergesagt werden, und für Sequenz aus *S. cerevisiae* sogar 12 Transmembrandomänen. Da die SMART-Vorhersage in Bezug auf Domänen durchaus ihre Grenzen hat wurden die gefundenen Sequenzen trotzdem als *TbSTT3* benannt.

Die Sequenz zwischen den Nukleotiden 45 und 824 wurde als geeignete Zielsequenz ausgewählt, da sie in allen vier Genen konserviert ist und somit die Möglichkeit bieten, alle Allele gleichzeitig auszuschalten. Die Primer STT3\_HindIII\_U1 und STT3\_BamHI\_L1 wurden verwendet, um den Genabschnitt aus genomischer DNA zu amplifizieren. Das gewonnene PCR-Produkt nach Verdau mit *Hind* III und *Bam* H I in pBSK ligiert. Die Sequenzierung des so gewonnenen Plasmids ergab nur wenige Unterschiede zwischen den Sequenzen der sequenzierten AnTat1.1-DNA und der Sequenz von TREU927 aus der Datenbank. Das Nukleotid A154 weist darauf hin, dass das Gen Tb927.5.890 amplifiziert worden war. Darüber hinaus unterscheiden sich die Sequenzen bei drei Nukleotiden ohne Konsequenz für die AS-Sequenz (C(288)T, G(735)A und A(792)G). Durch *Hind* III und *Bam* H I wiederum wurde das Fragment für die RNA-Interferenz aus dem Vektor herausgeschnitten und mit dem Plasmid p2T7 ligiert.

Von sechzehn Transfektionen insgesamt führten acht zu resistenten Zelllinien, von denen drei zur näheren Analyse ausgewählt wurden. Aufgrund des starken Einflusses der Tetrazyklininduktion auf das Populationswachstum wurde Zelllinie #5 zur weiteren Analyse ausgewählt. Für die Hybridisierung des Northern Blottes wurde Gesamt-RNA nach 8 h Induktion sowie ohne Induktion extrahiert und nach Gelelektrophorese geblottet. Als Hybridisierungssonde diente das PCR-Produkt, welches mit den spezifischen STT3-Primern auf Grundlage des pBSK.STT3 hergestellt wurde (Abb. 38A). Nach Exposition und Kontrollhybridisierung mit einer Sonde gegen die rRNA konnten zwei konkrete Banden für *TbSTT3* in den unbeeinflussten Zellen festgestellt werden, welche in den Tetrazyklin-induzierten Zellen nicht festzustellen waren. Aufgrund des genomischen Kontextes ist mit einer Transkriptgröße von etwa 3,3 kb zu rechnen, was der größeren der beiden Banden entsprechen würde. Die kleinere der beiden Banden kann durch die Transkription



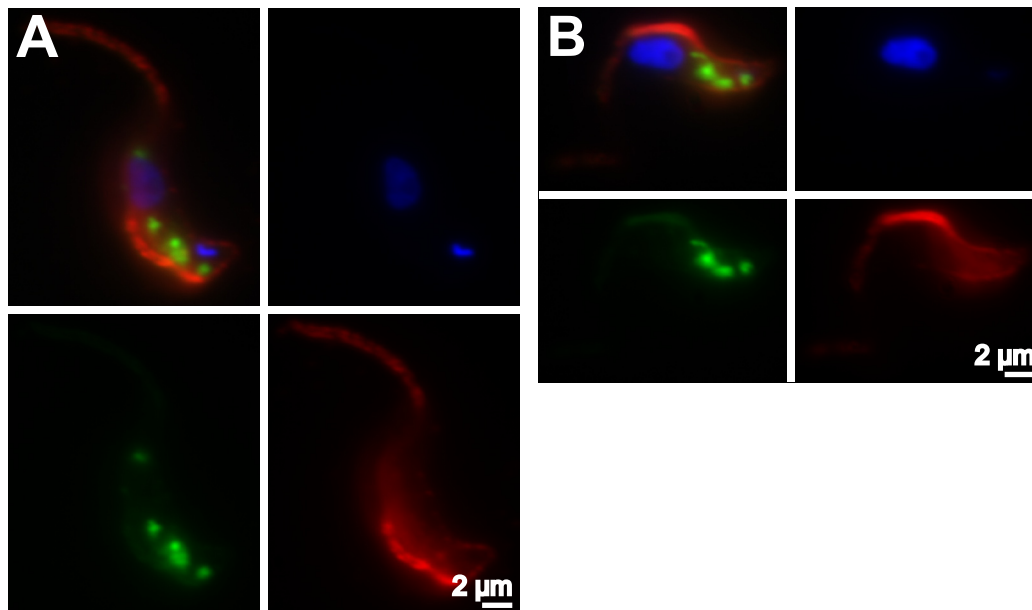
**Abb. 38: RNA-Interferenz gegen *TbSTT3*:** A) Hybridisierung der mRNA von STT3, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tet R.STT3</sup><sub>K.EG</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

von Tb927.5.880 erklärt werden, welches abgesehen von der starken Verkürzung 100% Nukleotididentität zu den drei vollständigen STT3-Allelen aufweist.

Nach Induktion der Interferenz verlangsamte sich zunächst das Wachstum aller drei unabhängigen Populationen (Abb. 38B). Während sich in der analysierten Zelllinie #5 schon 4 h nach Induktion eine deutliche Verzögerung des Populationswachstums abzeichnete, zeigten die anderen beiden Zelllinien diese Verzögerung erst verspätet. Trotz des unterschiedlichen Ausmaßes der Verzögerung begannen alle drei Populationen nach etwa 48 h abzusterben.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellen wurden Zellen nach 18 h Induktion fixiert und analysiert. Obwohl EP1:GFP nach wie vor auch in den Endosomen nachzuweisen war, zeigte sich zusätzlich eine leichte Oberflächenlokalisierung des Fusionsproteins. Um diese Lokalisation nachzuweisen, wurde die Oberfläche der fixierten Zellen mit  $\alpha$ -GFP behandelt und so die Lokalisation von EP1:GFP nach Induktion der RNAi gegen *TbSTT3* auf der gesamten Oberfläche gezeigt. Hierbei zeigte das Flagellum eine leicht verstärkte Fluoreszenz (Abb. 39).

Durch den *knock down* der Oligosaccharyltransferase konnte zwar nachgewiesen werden, dass N-Glycosylierungen eine wichtige Rolle bei der Ausschluss von GPI-verankerten Proteinen von der Zelloberfläche spielen. Allerdings konnte das Experiment nicht klären, ob die N-Glycosylierung des GPI-verankerten Proteins selbst oder die eines nicht bekannten Proteins in den Sortierungsmechanismus involviert ist. Um dies zu überprüfen wurde



**Abb. 39: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbSTT3*:** A-B) EP1:GFP gelangt nach Interferenz gegen *TbSTT3* auf die Zelloberfläche. Hierbei weist das Flagellum eine besonders starke Fluoreszenz auf. Das in der Plasmamembran verankerte EP1:GFP lässt sich in nicht-permeabilisierten Zellen spezifisch nachweisen. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: α-GFP (nur Plasmamembran), Grün: EP1:GFP.

eine Variante von EP1:GFP hergestellt, deren N-Glycosylierungsstelle durch Punktmutation zerstört war.

Als Grundlage für die Mutation durch PCR diente das Plasmid pBSK.EP1:GFP. Mittels der beiden Primer EP1\_T304A\_U und EP1\_T304A\_L wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Durch die PCR wurden die Nukleotide 907-909 ACT zu GCC mutiert, wodurch eine Schnittstelle für *Ehe* I entstand. Dadurch wurde die Mutation T304A verursacht und so die Signalsequenz für die N-Glycosylierung zerstört. Der entstandene offene Leserahmen wurde mit den Enzymen *Bam*H I und *Nde* I aus dem Vektor pBSK.EP1\_T304A:GFP herausgeschnitten und mit dem ebenso behandelten Vektor pLew82 ligiert. Der entstandene Vektor pLew82.EP1\_T304A:GFP wurde mit *Not* I linearisiert. Zur Transfektion wurde die Zelllinie M1.2<sup>tet<sub>Tb.VY</sub></sup> ausgewählt.

Nach Selektion mit 5 μg/ml Phleomycin und 1 μg/ml Tetrazyklin führten fünf Transfektionen zu vier stabilen und gut wachsenden Klonen. Allerdings wiesen die resistenten Zellen nur eine ausgesprochen schwache Fluoreszenz auf. Das niedrige Expressionsniveau ließ keine zuverlässige Aussage über eine mögliche Oberflächenlokalisation zu, da auch bei der wesentlich stärker exprimierenden Zelllinie M1.2<sup>tet<sub>R.STT3</sub><sub>K.EG</sub></sup> nur ein sehr geringer Anteil der Reporterproteine auf der pellikularen Zelloberfläche nachweisbar waren.

#### 4.2.1.6. Der *knock down* von *Tb*GEF2 führt zu einem pleiotropen Phänotyp

GTPasen wie die hochkonservierten ADP-Ribosylierungs-Faktoren (ARFs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Vesikeln. Die Aktivität dieser Hydrolasen wird durch Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) gesteuert. GEFs zeichnen sich vor allem durch die ebenfalls hochkonservierte Sec7-Domäne aus und beschleunigen nicht nur den Austausch von GDP gegen GTP, sondern binden ARFs auch an die jeweilige Membran.

In Säugerzellen sind bislang 6 unterschiedliche ARFs und 15 verschiedene GEFs identifiziert worden. Aufgrund der geringen Anzahl von ARFs im Vergleich zu den dazugehörenden GEFs der Sec7-Familie wurde postuliert, dass die Spezifität der Lokalisation und der Aktivierung auf den unterschiedlichen GEFs basiert (Casanova 2007). *Trypanosoma brucei* verfügt allerdings nur über die beiden ARF-orthologen Proteine *Tb*ARF1 und *Tb*ARF2 (Price *et al.*, 2005). Die BLAST-Suche wurde mit der Sec7-Domäne von pSEC7 (P11075, AS 621-807; *S. cerevisiae*) durchgeführt (Abb. 40). Zusätzlich wurden homologe Proteine zu den Proteinen pSec7, GEF1/BIG1 (NP\_006412; *H. sapiens*) und GEF2/BIG2 (NP\_006411; *H. sapiens*) gesucht und so die Ergebnisse ergänzt und verglichen. Die beiden wahrscheinlichsten GEFs Tb927.8.1840 (E-Wert:  $3,2 \times 10^{-18}$ ) und Tb927.4.2200 (E-Wert:  $3,0 \times 10^{-17}$ ) weisen in allen vier Analysen die höchste Homologie auf. Außer diesen beiden Proteinen besitzt auch Tb11.01.7610 (E-Wert:  $3,9 \times 10^{-09}$ ) laut SMART-Analyse eine Sec7-Domäne. Die anderen Sequenzen aus der Suche mit den gesamten Proteinsequenzen wurden vernachlässigt, da sie keine Sec7-Domäne aufweisen und zudem der größte Teil der Proteine als Dyneinuntereinheiten annotiert ist.

Die weiteren Domänen von BIG2 (Mouratou *et al.*, 2005) konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein Vergleich der konservierten Aminosäuren der postulierten DCB-Domäne ergab, dass die Sequenz Tb927.4.2200 zumindest eine gewisse Ähnlichkeit bezüglich der konservierten Aminosäuren aufweist. Bei den anderen beiden Sequenzen ist das Vorhandensein der konservierten Domänen unwahrscheinlicher, auch wenn es hier nicht endgültig bewiesen oder widerlegt werden konnte.

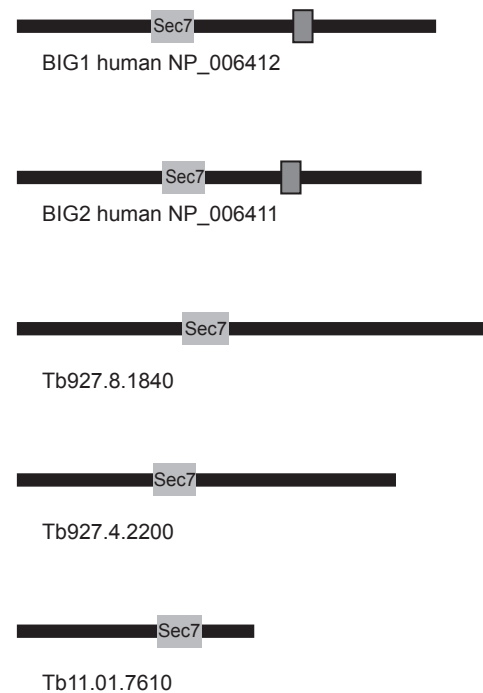
Der Vergleich dieser drei Sequenzen mit den menschlichen Proteinsequenzen ergab, dass GEF2/BIG2 vermutlich Tb927.8.1840 entspricht (E-Wert von  $3 \times 10^{-23}$ ), während Tb927.4.2200 vermutlich ein Ortholog zu GEF1/BIG1 ist (E-Wert von  $7 \times 10^{-23}$ ). Deshalb wird im weiteren Verlauf der Arbeit Tb927.8.1840 als *Tb*GEF2 bezeichnet. Die Zuordnung von Tb11.01.7610 ist aufgrund der SMART-Analysen nicht möglich (höchster E-Wert:  $1 \times 10^{-6}$ ).

Als Zielsequenz für die RNA-Interferenz wurden die Nukleotide 1805 bis 2180 der codierenden Sequenz ausgewählt. Der Bereich liegt direkt oberhalb der konservierten Sec7-Domäne.

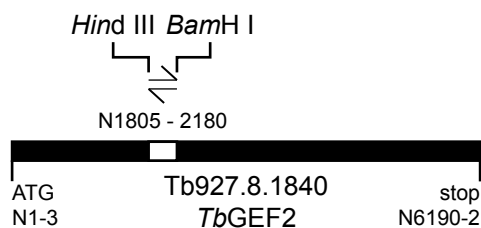
**A**

Sequenz-ID	Annotation	E-Wert
Tb927.8.1840/ Tb08.26N11.250	hypothetical protein, conserved	$4,0 \times 10^{-28}$
Tb927.4.2200/ Tb04.1H19.220	hypothetical protein, conserved	$2,0 \times 10^{-25}$
Tb927.4.2070/ Tb04.29M18.750	antigenic protein, putative	$8,3 \times 10^{-24}$
Tb927.7.4130/ Tb07.5F10.450	hypothetical protein, conserve	$1,7 \times 10^{-23}$
Tb11.01.7610	hypothetical protein, conserved	$8,4 \times 10^{-21}$
Tb927.8.3250/ Tb08.28L1.260	dynein heavy chain, putative	$4,2 \times 10^{-19}$
Tb927.3.930/ Tb03.27F10.490	dynein heavy chain, putative	$1,4 \times 10^{-17}$

**B**



**C**

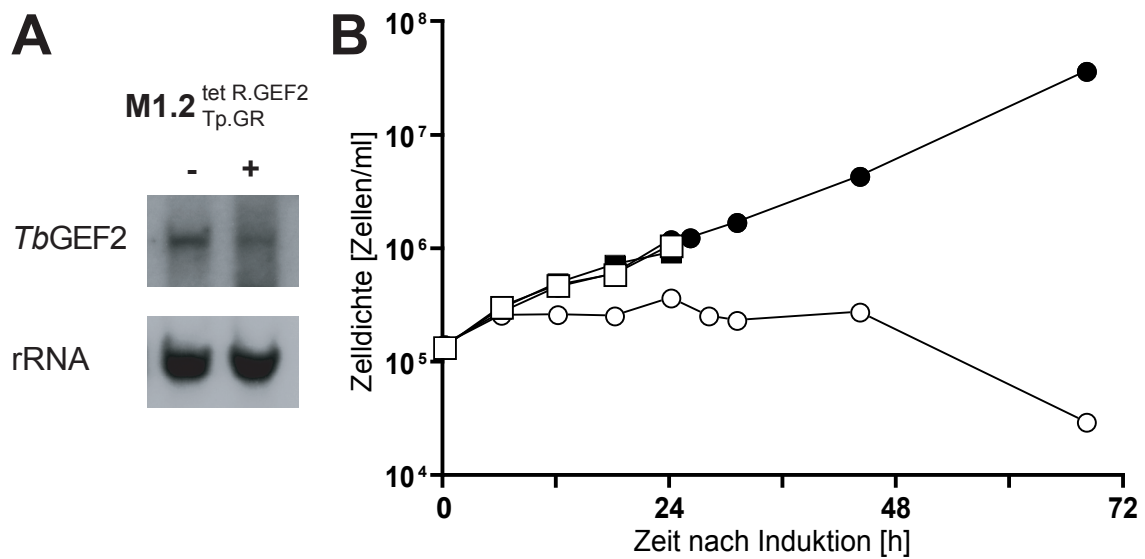


**Abb. 40: *In silico*-Identifizierung von Sec7-Proteinen aus *T. brucei*.** A) Vergleich der Ergebnisse von BLAST-Suchen mit unterschiedlichen Anfragesequenzen. B) Vergleich der Domänenstruktur der Guanosinnukleotidaustauschfaktoren BIG1/GEF1 und BIG2/GEF2 mit den in *T. brucei* gefundenen Sec7-Proteinen. Die Rechtecke mit Rahmen kennzeichnen die Sec7 assoziierte DUF1981-Domäne, die C-terminal mit der Sec7-Domäne assoziiert ist. C) Auswahl des für die RNA-Interferenz geeigneten DNA-Abschnittes

Mittels der Primer GEF2\_HindIII\_U1 und GEF2\_BamHI\_L1 wurde dieses Segment auf Basis der genomischen DNA von AnTat1.1 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Behandlung mit Hind III und BamH I in pBSK kloniert und nach Sequenzierung wurde dieses Segment aus dem pBSK in den RNAi-Vektor p2T7 ligiert.

Von fünf Transfektionen in die Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG</sub> führt nur eine zu einer resistenten Zelllinie. Die induzierten Zelllinie zeigte innerhalb von 12 eine deutliche Beeinträchtigung des Populationswachstums und starb nach 52 h ab. In diesem Verlauf wurden die Zellen deformierter. Insbesondere der Anteil von Zellen mit mehreren Flagellen nahm stark zu. Die spezifische Abnahme an mRNA von *TbGEF2* nach 8 h Induktion wurde mittels Northern Blot gezeigt. Als Sonde wurde das RNAi-Fragment verwendet. Abbildung 41A zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung sowie der Kontrollhybridisierung mit der rRNA-Sonde. Die Hybridisierung mit der Sonde für *TbGEF2* zeigte ein abgeschwächtes Signal bei einem höheren unspezifischen Hintergrund.





**Abb. 41: RNA-Interferenz gegen *TbGEF2*:** A) Hybridisierung der mRNA von *TbGEF2*, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tet R.GEF2</sup><sub>Tp.GR</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

Nach 48 h Induktion war eine allgemeine Abnahme der Fluoreszenz durch GFP festzustellen, ohne dass eine spezifische Delokalisation zu beobachten war. Um den Einfluss der Interferenz auf den Golgi-Apparat zu untersuchen wurde das Experiment mit der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>Tp.GR</sub> wiederholt. In diesem Fall führten zwei Transfektionen zu zwei unabhängigen, klonalen Zelllinien. Nach Induktion mit Tetrazyklin reagierte allerdings nur einer der beiden Klone durch Wachstumsarrest nach 6 h Induktion (Abb. 41B). Dieser Klon wies nach 6 h Induktion kein Populationswachstum mehr auf. Bis etwa 48 h nach Induktion blieben die Zelldichten nahezu konstant. Danach starb die Population ab. Nach 12 h wiesen alle Zellen eine starke Deformierung auf. Die eigentliche Zelldichte dieser Kultur sank aber erst nach etwa 50 h Induktion ab. Nach 80 h konnten keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Der zweite induzierte Klon zeigte keine Beeinträchtigung in Wachstum oder Morphologie durch die Tetrazyklininduktion.

Die Auswirkung des GEF2-Mangels wurde 17 h nach der Induktion näher beobachtet, da zu diesem Zeitpunkt die Deformierung noch nicht so ausgeprägt war, dass sämtliche intrazellulären Strukturen in Mitleidenschaft gezogen worden waren. Das ohnehin schwache Fluoreszenzsignal von DsRed wurde durch die Methanolfixierung der Zellen verringert und unterschritt die Detektionsgrenze, so dass nur in 25% der nichtinduzierten Zellen eine Golgifluoreszenz feststellbar war. Deshalb sind keine abschließenden Aussagen zu der Integrität des Golgi-Apparates nach *knock down* von *TbGEF2* möglich. Da die mögliche allgemeine Störung der Golgi-Struktur jedoch nicht allein den Transport von GPI-verankerten Proteinen betrifft, wurde von einer weiteren Analyse der Zellen im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

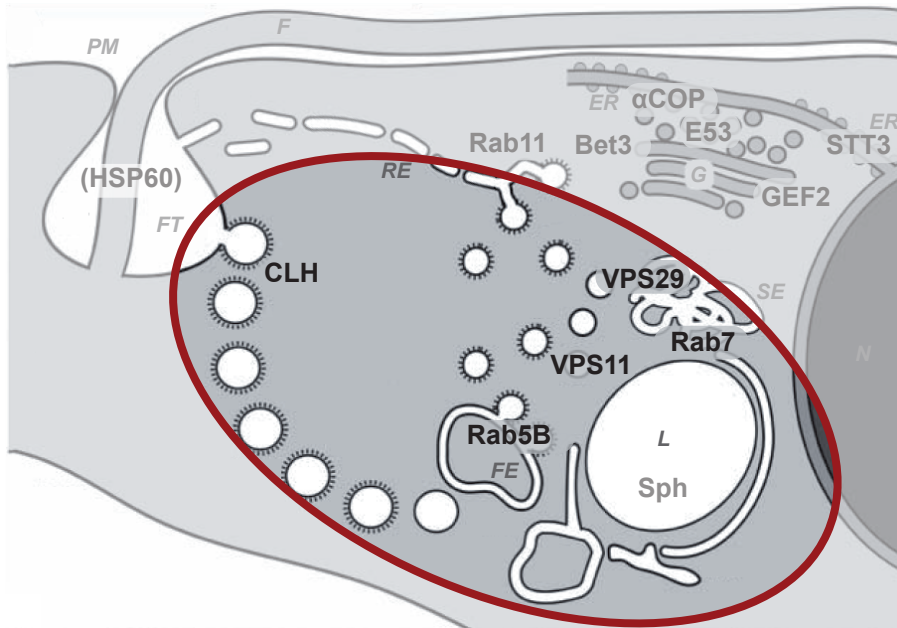


Abb. 42: Zielsequenzen von Regulatoren der endozytischen und expzytischen Transportwege

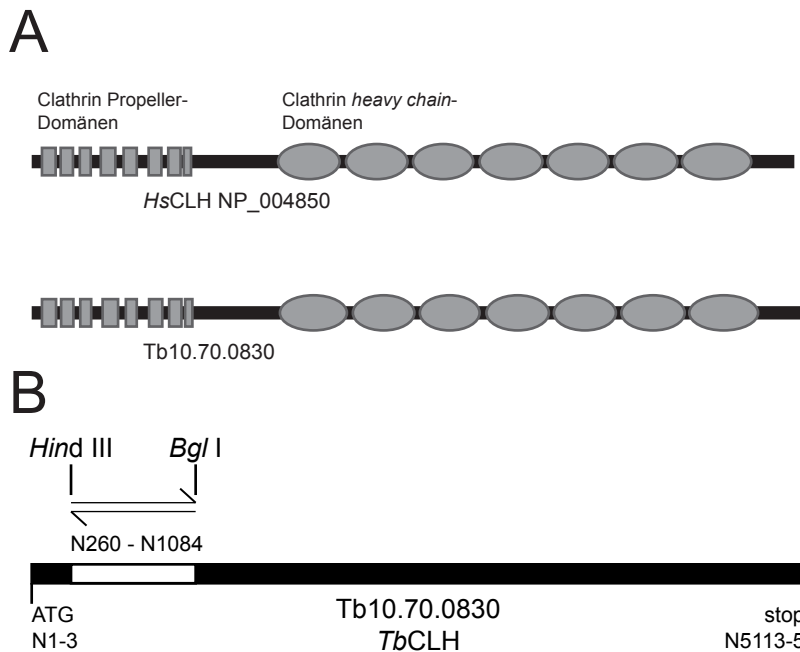
#### 4.2.2. EP1:GFP im endozytotischen und exozytotischen Transportweg

Die weiteren untersuchten Zielproteinen spielen vor allem im Bereich der Endosomen eine Rolle und sind involviert bei der Sortierung von GPI-verankerten Proteinen, welche bereits zur Zelloberfläche bzw. zur Flagellartasche transportiert wurden. Bei diesen Proteinen ist somit eine gesonderte Betrachtung zwischen biosynthetischen Transportweg und dem *recycling* nicht ohne weiteres möglich. Abbildung 42 gibt eine Übersicht über die in diesem Kapitel untersuchten Proteine.

##### 4.2.2.1. GPI-verankerte Proteine akkumulieren im Lumen der Flagellartasche

Die Abundanz von Clathrin-positiven Vesikeln um die Flagellartasche herum und die Colokalisation von endozytierten VSGs mit Clathrin (Grünfelder *et al.*, 2002) weisen auf eine essentielle Rolle von Clathrin bei der Endozytose von GPI-verankerten Proteinen hin. Hinzu kommt, dass die Komponenten von alternativen Endozytosemechanismen wie Cavaeolin nicht in *T. brucei* identifiziert werden konnten. Um nachzuweisen, ob GPI-verankerte über Clathrin endozytiert werden, wurde die schwere Kette von Clathrin als Ziel für die RNA-Interferenz ausgewählt und so die Clathrin-vermittelte Endozytose blockiert.

Die orthologe Sequenz Tb10.70.0830 ist in der Datenbank als schwere Clathrinkette annotiert. Die Überprüfung der Sequenz mittels BLAST mit der humanen Sequenz



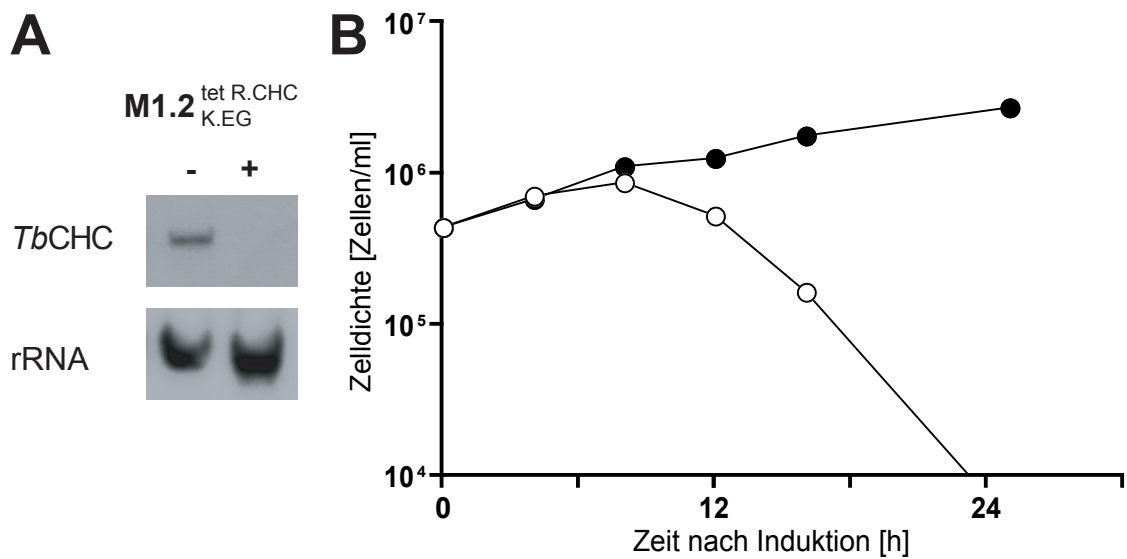
**Abb. 43: *In silico*-Identifizierung der schweren Clathrin Kette (CLH):** A) Vergleichende SMART-Analyse mit Sequenz des humanen Proteins. B) Auswahl des Genfragmentes zur RNA-Interferenz.

NP\_004850 führte zu einem E-Wert von 0, der die Identität für die weiteren Experimente hinreichend belegt.

Der Vergleich mittels der SMART-Domänenanalyse ergab, dass beide Proteine nahezu identisch aufgebaut sind (Abb. 43). Der N-Terminus des Proteins besteht aus 8 aufeinanderfolgende Clathrin-Propeller-Domänen bis zur Aminosäure 356. Nach einem Bereich ohne charakteristische Domäne schliessen sich ab der Aminosäure 541 sieben Clathrin-schwere-Ketten-Wiederholungen an. Die Positionen der Clathrin-Domänen unterscheiden sich zwischen der humanen und der trypanosomalen Sequenz geringfügig. Die dazugehörigen E-Werte sind bei Tb10.70.0830 wesentlich höher (ca. bei  $10^{-15}$ ) als bei dem humanen Protein (ca. bei  $10^{-45}$ ). In diesem Bereich findet die Bindung der leichten Kette von Clathrin (CLC) statt, dessen Ortholog in *T. brucei* wesentlich weniger stark konserviert ist (Heddergott, Diplomarbeit).

Als Zielsequenz für die Interferenz der schweren Kette von Clathrin wurde das Segment von Nukleotid 261 bis 1084 (entspricht den AS 88 bis 361) mit der zweiten bis achten Propellerdomäne der schweren Kette ausgewählt und richtet sich somit gegen Clathrin-spezifische Domänen, um das Risiko von Nebeneffekten auf VPS-Gene, die ebenfalls zu verringern.

Um an die Sequenz die geeigneten Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *Hind* III und *Bgl* II anzufügen wurden die Primer CLH\_HindIII\_U1 und CLH\_BglII\_L1 entworfen. Das auf Basis der genomischen DNA von AnTat1.1 erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Hind* III und *Bgl* II geschnitten und mit dem *Hind* III und *Bam*H I geschnittenen p2T7-Vektor ligiert.



**Abb. 44: RNA-Interferenz gegen *TbCLH*:** A) Hybridisierung der mRNA von CLH, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tetR.CLH</sup><sub>K.EG</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

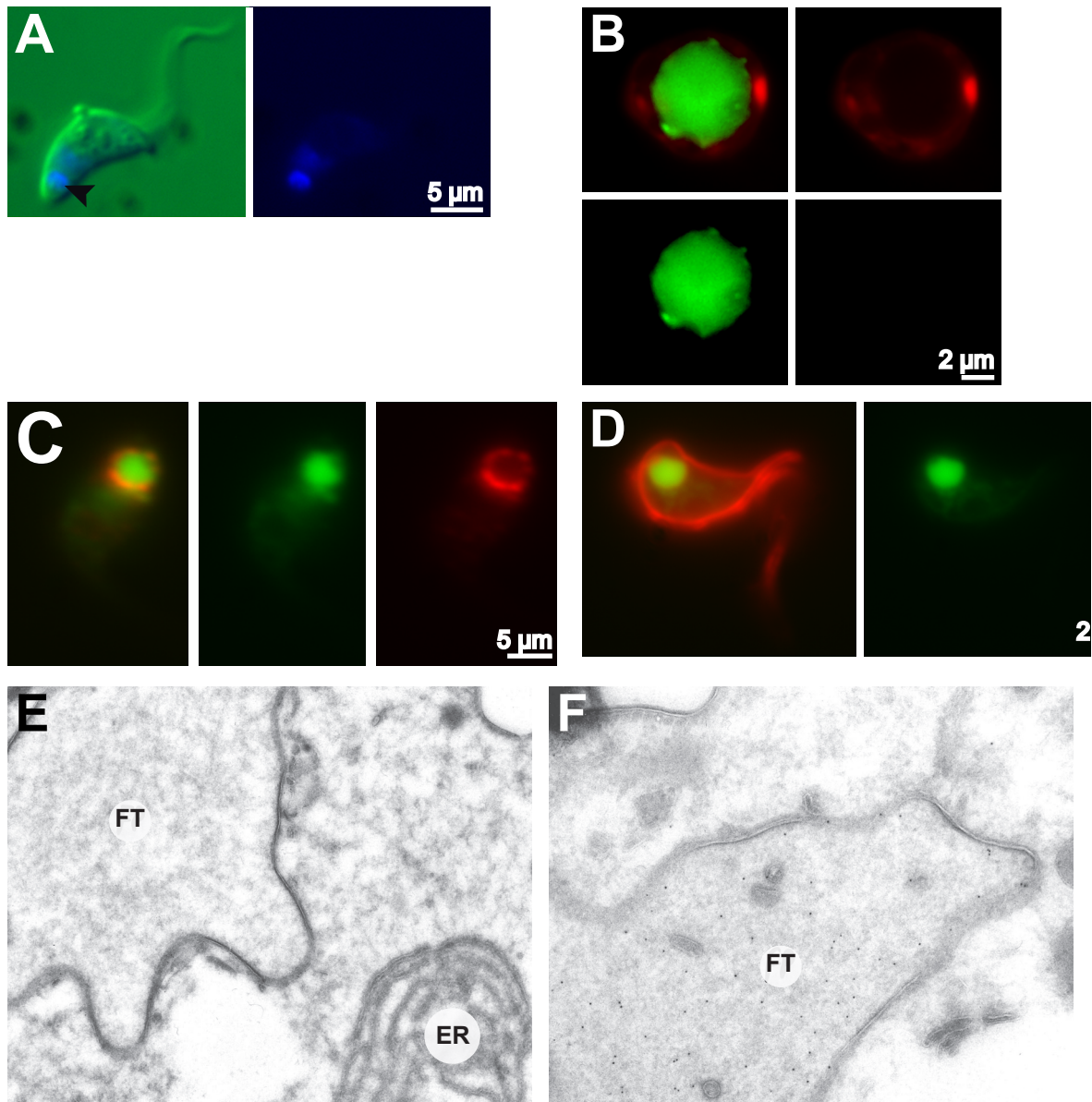
Bis auf die stille Mutation t903a stimmte die Nukleotidsequenz des amplifizierten Fragmentes des CLH-Gens von AnTat1.1 mit der Sequenz Tb10.70.0830 aus TREU927 überein.

Zehn Transfektionen der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG</sub> mit dem RNAi-Vektor p2T7.CLH führte zu acht resistenten Zelllinien. Die Transfektanten wiesen eine leicht erhöhte Verdopplungszeit von 10-13 h gegenüber 7,5 h der ursprünglichen Zelllinie auf. Der Abbau der Clathrin-mRNA wurde exemplarisch in einer Zelllinie durch Hybridisierung von Gesamt-RNA mit dem durch PCR amplifizierten Fragment von *TbCLH* aus dem Vektor pBSK.CLH bestätigt. Abbildung 44A zeigt die Daten nach 24 h Exposition und anschließender zweiten Hybridisierung mit einer rRNA-Sonde.

Nach Induktion zeigte sich eine deutliche Verzögerung des Populationswachstums. Nach 8 h Induktion begann die Population abzustarben und nach 25 h konnten keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden (Abb. 44B).

Im Verlauf der Induktion waren die Zellen zunehmend deformiert und rundeten sich ab. Nach 12 h war der größte Teil der Zellen bereits stark abgerundet, so dass die Schwimmbewegung stark beeinträchtigt war. In diesen Zellen akkumulierte EP1:GFP in einer runden Struktur auf, die mit andauernder Induktionszeit immer größer wurde. Nach 16 h Induktion waren alle Zellen stark abgerundet und das Flagellum löste sich von der pellikularen Membran ab. Zu diesem Zeitpunkt war EP1:GFP ausschließlich in der runden Struktur nachzuweisen, die fast das gesamte Zellvolumen einnahm.

Zur näheren Charakterisierung dieser Struktur wurde der RNAi-Vektor in die zweite Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG Tb.VY</sub> transfiziert, die nicht nur EP1:GFP, sondern auch das fluoreszierende VSG'Y' exprimiert. VSG'Y' dient als fluoreszierender Marker für die Zelloberfläche. Nach



**Abb. 45: Der *knock down* von *TbCLH* führt zur Akkumulation von EP1:GFP im Lumen der Flagellartasche:** A) EP1:GFP akkumuliert nach 6 h Interferenz gegen *TbCLH* am anterioren Zellpol. Blau: EP1:GFP, Grün: Kontrastverstärkung durch Nomarski-Optik. B) EP1:GFP akkumuliert nach 16 h Interferenz gegen *TbCLH* in der Flagellartasche. Rot: VSG'Y' (Oberflächenmembran), Grün: EP1:GFP. C) *TbCLH* ist nach 6 h Induktion der RNA-Interferenz noch direkt an der Flagellartasche nachweisbar. Rot: *TbCLH*, Grün EP1:GFP. D) Die Endozytose von VSG ist nach 7 h Induktion der RNA-Interferenz gegen *TbCLH* blockiert. Rot: Streptavidin-Alexa594 (VSG), Grün: EP1:GFP. E-F) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen nach 14 h Induktion. Die 6 nm Goldpartikel markieren die schwere Kette des Clathrin (E) bzw. GFP (F). Auffällig ist die starke Reduktion an intrazellulären Membranen. FT: Flagellartasche; ER: ER.



Induktion der Interferenz in diesen Zellen zeigte sich der gleiche morphologische Phänotyp (Abb. 45). In diesen Zellen war deutlich zu sehen, dass die Membran der runden Struktur mit VSG'Y' bedeckt ist und somit extrazellulär sein muss. Somit muss es sich um die stark vergrößerte Flagellartasche handeln. Durch Biotinylierung und anschließender Endozytose des VSG konnte gezeigt werden, dass in den betreffenden Zellen keine Endozytose mehr stattfindet (Abb. 45D). Die Detektion durch Streptavidin weist die ausschließliche Oberflächenlokalisierung von biotinyliertem VSG nach.

Zur Bestätigung dieser Beobachtungen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die entsprechenden Zellen wurden mit  $\alpha$ -CLH- beziehungsweise mit  $\alpha$ -GFP-Antikörpern inkubiert und die jeweiligen Proteine durch 6 nm Gold-Partikel nachgewiesen. Während die schwere Clathrinkette nicht mehr detektierbar ist, zeigt sich deutlich die Menge an GFP im Lumen der Flagellartasche. Auffällig ist die starke Verringerung an intrazellulären Membranen. Während experimentell unbeeinflusste Trypanosomen reichlich über unterschiedlichste Membranen im Zytoplasma verfügen, zeigte sich nach 14 h RNA-Interferenz, dass nur wenig Vesikel und Membranmaterial im Zytoplasma vorliegt. Der Mangel an Clathrin und damit an der Endozytose führt also zum ungehinderten Transport der endosomalen Membranen zur Plasmamembran und weist daraufhin, dass nicht die Persistenz der Endosomen im Zytoplasma, sondern die stattfindende Exozytose favorisiert wird.

#### **4.2.2.2. *TbRab5b* beeinflusst den Membranfluss an der Flagellartasche**

*Trypanosoma brucei* besitzt zwei Rab5-Isoformen, die im prozyklischen Stadium in Trypanosomen kolokalisiert sind, im Blutstromstadium allerdings nicht. Eine unterschiedliche Rolle bei dem Transport von endozytierten Proteinen wurde postuliert (Pal *et al.*, 2002a). Rab5 dient gleichzeitig als anerkannter Organellmarker für frühe endosomale Strukturen und ist vermutlich an der Fusion von endozytierten Vesikeln mit den frühen Endosomen beteiligt. In *T. brucei* dekorieren beide Isoformen frühe Endosomen mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Proteinen. Während *TbRab5a* mit Transferrin, VSGs und ISG65 kolokalisiert, befindet sich ISG100 in *TbRab5b*-positiven frühen Endosomen (Field *et al.*, 1998). Der *knock down* von *TbRab5a* und *TbRab5b* führte zu einer vergrößerten Flagellartasche und verhinderte den Transport von endozytiertem Concanavalin A zum Lysosom (Hall *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Experimente wurde eine eher geringe Beteiligung von *TbRab5b* an der Endozytose postuliert. Da auch die Funktion der ISGs bislang nicht geklärt werden konnte, sollte zur näheren Charakterisierung jetzt *TbRab5b* ausgeschaltet werden, da die ausschließliche Lokalisation mit ISG100 eine spezifischere Funktion vermuten lässt.

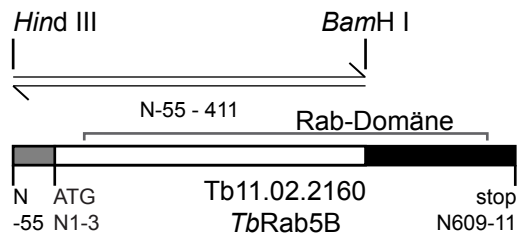


Abb. 46: Position der für die RNA-Interferenz ausgewählten Fragmente in *TbRab5B*.

Bei *TbRab5b* (Tb11.02.2160) wurde die Sequenz zwischen Nukleotid -55 und Nukleotid 411 gewählt (Abb. 46), mit den Primern Rab5B\_*Hind*III\_U1 und Rab5B\_*Bam*HI\_L1 amplifiziert und ebenfalls nach Behandlung *Hind* III und *Bam* H I in die beiden Vektoren gebracht. Nach Sequenzierung wurden die Sequenzen von AnTat1.1 und TREU927 verglichen. Im amplifizierten Bereich wich die Nukleotidsequenz in vier Stellen von der Sequenz in TREU927 ab: c156 ist t156, c189 ist t189, g306 ist a306 und letztlich g366 a366 in AnTat1.1. Alle diese Unterschiede bewirken allerdings keine unterschiedliche Aminosäuresequenz. Die Expression von Rab5B in den induzierten Zellen wurde durch Hybridisierung von Northern Blots überprüft. Als Sonde wurden das PCR-Produkt verwendet, das mit den oben beschriebenen Primern aufgrund des Plasmids pBSK.Rab5B hergestellt worden war. Abbildung 47A zeigt die Expression von Rab5b im Vergleich zu der Kontrollhybridisierung mit einer Sonde gegen rRNA. Das Wachstum der induzierten Zellen wurde über 13 h verfolgt. Die Zelllinie mit der Interferenz gegen Rab5b zeigte bereits innerhalb von 13 h eine deutliche Reaktion. Nach etwa 9 h begannen die Zellen abzustarben (Abb. 47B).

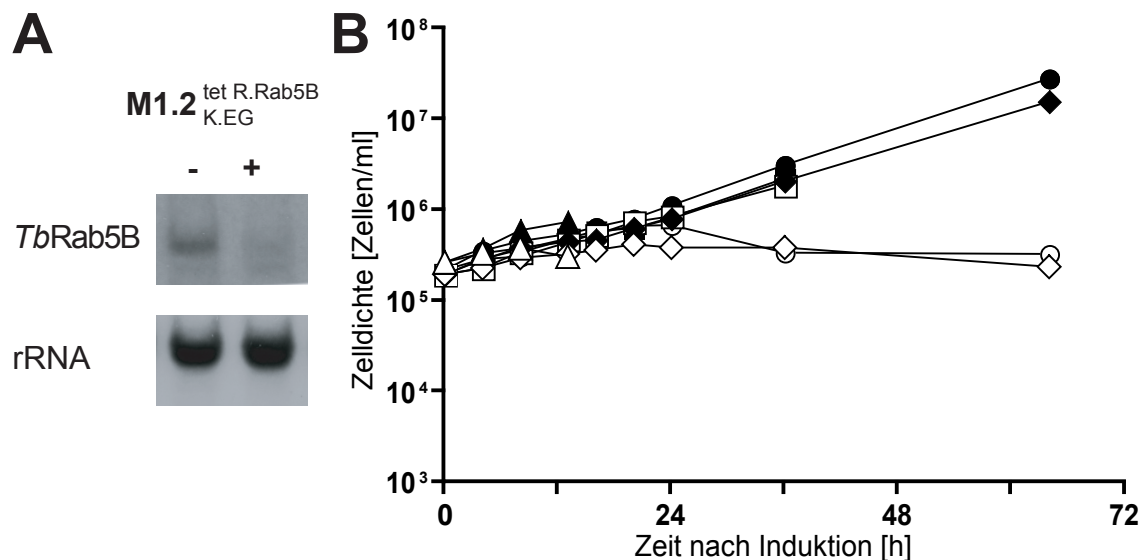
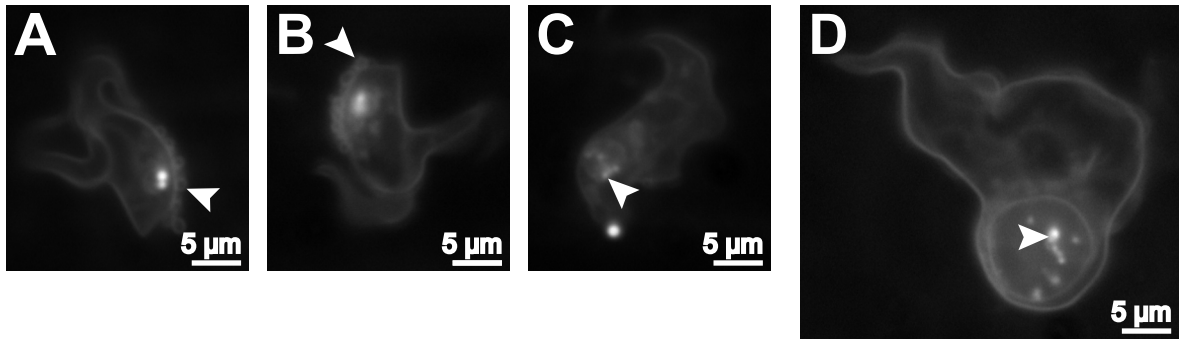


Abb. 47: RNA-Interferenz gegen *TbRab5B*: A) Hybridisierung der mRNA von Rab5B, (+) 8 h nach Induktion der RNA-Interferenz, (-) nicht induziert. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer Sonde gegen rRNA hybridisiert. B) Wachstum von M1.2<sup>tet R.Rab5B</sup> K.EG nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.





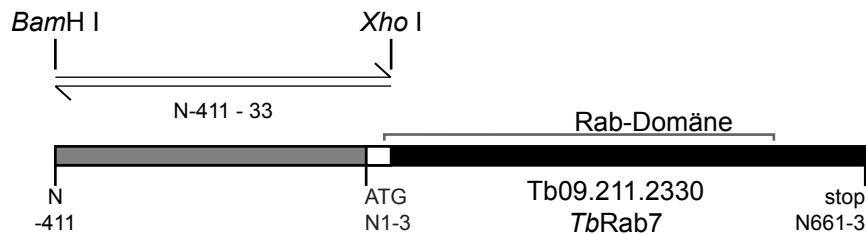
**Abb. 48: Die RNA-Interferenz gegen *TbRab5B* führt zur Ausbildung von Liposomen-ähnlichen Strukturen in der Flagellartasche und an der Einmündung des Flagellums:** A-B) Die Gegenfärbung von FM 2-10 zeigt die Ausprägung von Liposomen-ähnlichen Strukturen am Flagellum nahe der Einmündung in die Flagellartasche. C-D) Auch im Lumen der Flagellartasche sind diese Liposomen-ähnlichen Strukturen zu finden. Die Pfeile bezeichnen jeweils die Strukturen.

Der *knock down* von Rab5B führte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Hall *et al.* (2004) zu einer vergrößerten Flagellartasche und demnach zu einer Beeinträchtigung der Endozytose. Abbildung 48 zeigt die in einem signifikanten Anteil der Zellen nach 16 h Induktion beobachtete Ausbildung von einzelnen oder mehreren Ausstülpungen nahe der Einmündung des Flagellums in die Flagellartasche. Da diese Strukturen nach Fixierung mit Paraformaldehyd nicht mehr festzustellen waren, wurden die Zellen lebend untersucht. Mittels des Lipidfarbstoffs FM2-10 wurde die Plasmamembran der Zellen angefärbt. Die Zellen zeigen deutlich die zusätzlichen runde Vesikel nahe der Flagellartasche (Abb. 48A-B). Bei einigen Zellen war eine Vielzahl dieser Auswüchse zu beobachten, die sich entlang des Flagellums anordneten. Andere Zellen zeigten deutlich ähnliche Ansammlungen im Lumen der Flagellartasche (Abb. 48C-D). Die Anfärbung dieser Strukturen durch FM 2-10 sowie die Tatsache, dass sie nicht durch Paraformaldehyd fixierbar sind, weisen auf einen hohen Lipidanteil hin, wobei ein Proteinanteil nicht ausgeschlossen werden kann.

#### **4.2.2.3. *TbRab7*-Mangel führt zur Lokalisation von EP1:GFP in einer tubulären Struktur**

Rab7 ist ein Marker für späte Endosomen, die auch am Transport von GPI-verankerten Proteinen beteiligt sind. Allerdings sind nur 60% der Rab7-positiven Strukturen in den Transport von VSG eingebunden (Engstler *et al.*, 2004), während das gesamte Kompartiment für Flüssigphasemarker zugänglich ist. Demnach findet im Rab7-positiven spätendosomalen Kompartiment eine Sortierung von löslicher Fracht der Vesikel und membrangebundenen Rezeptoren und VSGs statt.

*Clathrin coated vesicles* II transportieren sowohl Membranmaterial als auch Flüssigphase zu den späten Endosomen. Diese Vesikel enthalten allerdings kein VSG (Grünfelder *et al.*, 2003), dessen Lokalisation intrazellulär mit dem von EP1:GFP übereinstimmt. Die



**Abb. 49: Auswahl des Fragmentes für die RNA-Interferenz gegen *TbRab7*.**

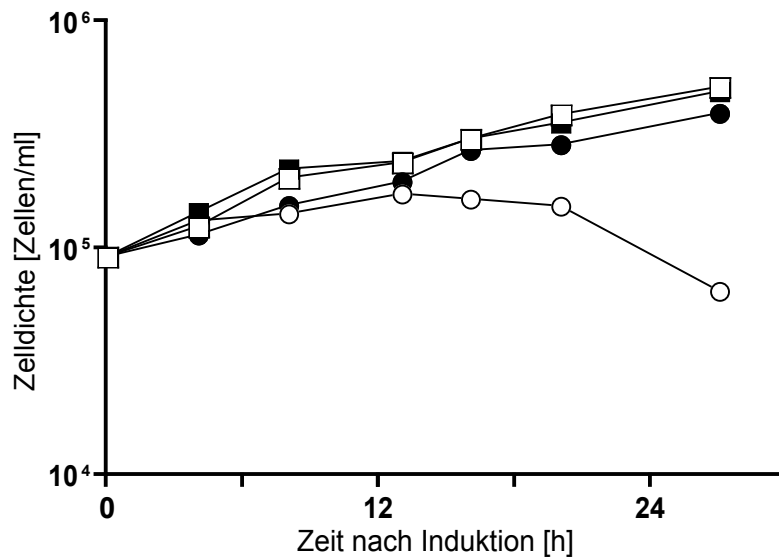
Transportwege von VSG und EP1:GFP in das spätendosomale Kompartiment ist bisher nicht näher charakterisiert worden.

VSG und damit vermutlich auch EP1:GFP muss also auf anderen Weg in die späten Endosomen gelangen. Um diesen Transportweg näher zu beleuchten, wurde *TbRab7* mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Da RNA-Interferenz die Neusynthese des Zielproteins verhindert, wird der *TbRab7*-abhängige Transport aus den späten Endosomen verringert und dadurch alternative Transportrouten favorisiert oder ein Rückstau verursacht.

Nach wie vor gibt es nur Hinweise darauf, ob das Reifungsmodell auf die späte Endosomen zutrifft oder das Modell des stabilen Kompartiments. Da die RNA-Interferenz vor allem die Neubildung von späten Endosomen blockiert, sollte sich die Lokalisation von EP1:GFP im Falle des Reifungsmodells nur wenig ändern: die Rab7-positiven Strukturen fallen weg und der gesamte Anteil an EP1:GFP würde zu den exozytischen Carriern transportiert werden. Sollten die späten Endosomen als stabiles Kompartiment vorliegen, wäre eine Fehllokalisierung zu erwarten: da der Transport zu den späten Endosomen stattfindet, würden sich die Carriervesikel mit EP1:GFP anhäufen und ggf. mislokalisiert werden.

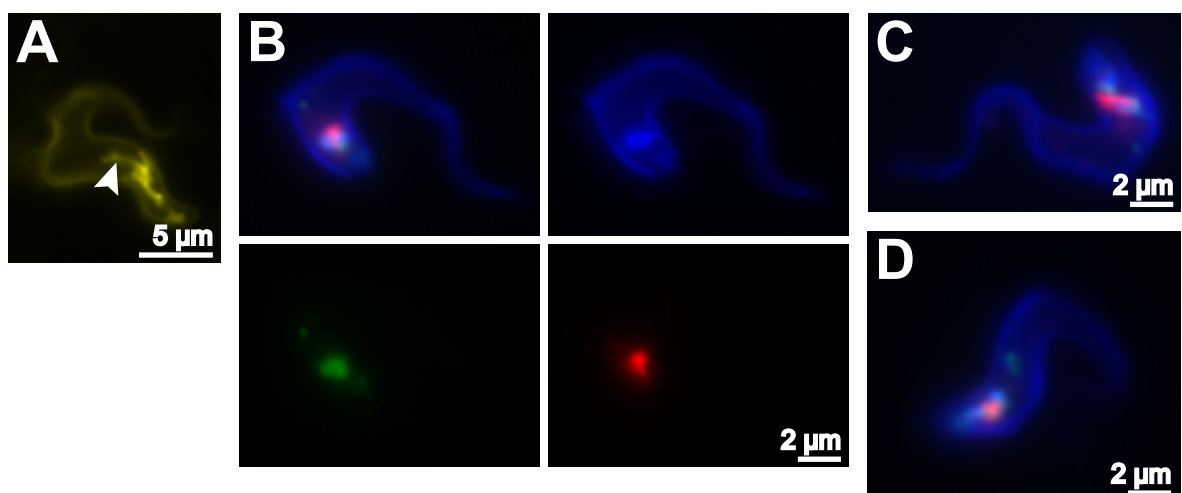
Das orthologe Gen in *T. brucei* Tb09.211.2330 wurde bereits identifiziert (M. Boshart, nicht publiziert). Die Rab-Domäne (AS 8 bis 190) weist das Gen als Mitglied der Rab-GTPasen aus und umfasst den größten Teil des 220 AS-Proteins. Um unspezifische Effekte zu vermeiden war deshalb die 5'-UTR von *TbRab7* als RNAi-Zielsequenz ausgesucht worden. Mittels der angefügten Restriktionsschnittstellen *BamH I* und *Xho I* wurden die letzten 411 Nukleotide der 5'-UTR sowie die ersten 33 codierenden Nukleotide von *TbRab7* als Zielsequenz ausgewählt (Abb. 49). Die Primer Rab7\_BamHI\_U1 und Rab7\_XhoI\_L1 wurden benutzt, um das geeignete DNA-Segment herzustellen. Das Produkt wurde zunächst in p2T7 ligiert und zur Sequenzierung dann noch einmal in pBSK.

Als fluoreszierendes Fusionsprotein wurde zunächst EP1:GFP in der Zelllinie M1.2<sup>tet</sup><sub>K.EG</sub> ausgewählt. Nach der Transfektion überlebten fünf Zelllinien die Selektion mit Phleomycin. Nur bei drei Zelllinien beeinflusste die Zugabe von Tetrazyklin das Wachstum. Beide Klone wurden nach der Feststellung eines Effektes von Tetrazyklin auf das Populationswachstum zunächst bezüglich der Lokalisation von EP1:GFP in lebenden Zellen und fixierten Zellen untersucht worden und Stabilate hergestellt worden. Nach Auftauen der Kryostabilate und einer kurzen Kultivierungsdauer ließ sich der Effekt der RNAi nicht reproduzieren. Nach erneuter Transfektion bildeten die Zellen allerdings die beobachteten Strukturen aus. Dies



**Abb. 50: RNA-Interferenz gegen *TbRab7*:** Wachstum von M1.2<sup>tetR.Rab7</sup><sub>K.EG</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

bestätigte die Beobachtung bei fast allen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Zelllinien, dass nach längerer Kultivierung die Auswirkung der Induktion nachlassen kann. Die Zelllinien zeigten diesen Effekt nach Kultivierung von insgesamt drei Wochen in unterschiedlichem Ausmaß: bei der einen Zelllinie trat nach wie vor innerhalb von 12 h ein deutlich verlangsamtes Wachstum (Abb. 50) ein, die andere wies ein unbeeinträchtigtes Wachstumverhalten auf. Nach 26 h gab es nur noch stark deformierte Zellen.



**Abb. 51: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbRab7*:** A) EP1:GFP zeigt in lebenden Zellen die Ausbildung von einer länglichen Struktur nach 24 h RNA-Interferenz gegen *TbRab7*. B-D) EP1:GFP ist in mit Paraformaldehyd fixierten Zellen nach 24 h Interferenz mit endozytiertem VSG zum größten Teil nahe dem Lysosom colokalisiert. Rot: *Tbp67* (Lysosom); Blau: Streptavidin-Alexa350 (VSG); Grün: EP1:GFP.

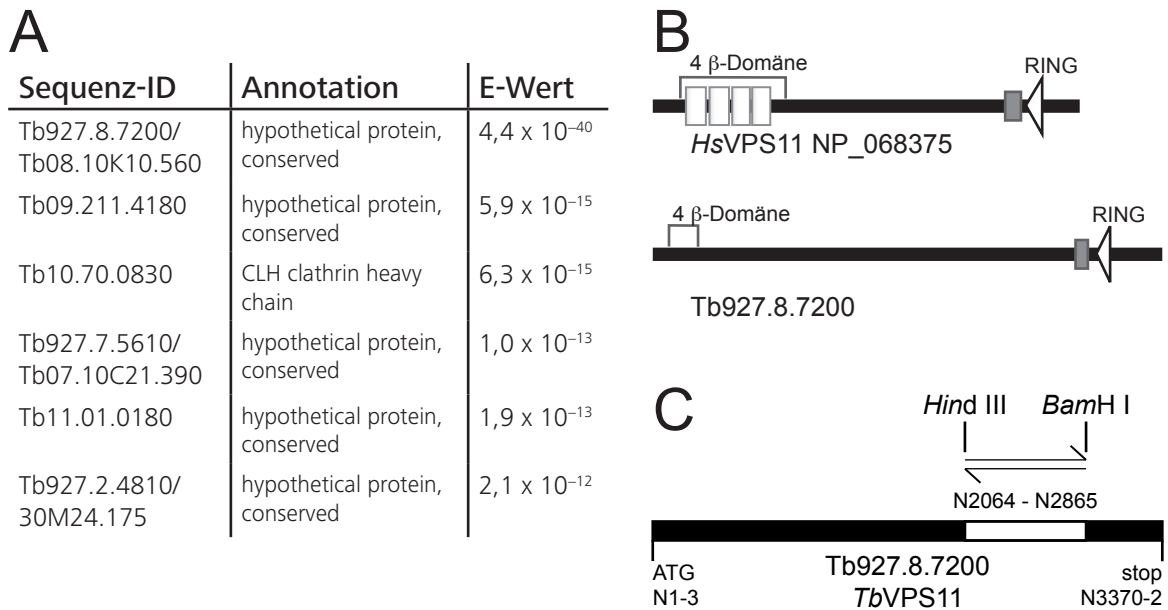
Mit der Induktion der Interferenz änderte sich die zelluläre Lokalisation von EP1:GFP in der Zelle dramatisch. Nach 8 h Induktion zeigte sich eine Ansammlung von EP1:GFP in einem kleinen Areal. Aus diesem Bereich bildeten sich längliche Strukturen, die sich zum anterioren Teil der Zelle hinstreckten (Abb. 51A).

Zur näheren Charakterisierung der Lokalisierung des EP1:GFP wurden Zellen chemisch fixiert und untersucht. Die Verteilung der EP1:GFP-Fluoreszenz in fixierten Zellen unterschied sich jedoch stark von der Verteilung in lebenden Zellen (Abb. 51B-D). Offensichtlich sind die Membranstrukturen, zu denen der Mangel an *TbRab7* führt, nicht fixierbar und können nur in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Die Lokalisation von EP1:GFP nahe dem Lysosom ist allerdings fixierbar und die Nähe von EP1:GFP zum Lysosom nach 24 h RNA-Interferenz-Induktion ist durch Gegenfärbung des Lysosoms sichtbar. EP1:GFP ist hierbei deutlich mit endozytiertem VSG colokalisiert. Wenn man berücksichtigt, dass nur ein Teil des spätendosomalen Kompartimentes für VSG zugänglich ist (Engstler *et al.*, 2004), legt dies den Schluss nahe, dass in diesem Kompartiment auch die Trennung von VSG und EP1:GFP stattfindet. Durch die chemische Labilität des Zielkompartimentes von EP1:GFP ist dies bislang allerdings nicht deutlich nachweisbar.

#### **4.2.2.4. *TbVPS11* reguliert den endozytischen Transportweg bei den späten Endosomen**

Bei der spezifischen Vermittlung der Vesikelfusion spielen Tethering-Komplexe eine entscheidende Rolle. Zu diesen Proteinkomplexen gehört neben dem TRAPP-Komplex und dem Exozyst auch der sogenannte HOPS-Komplex, der durch die spätendosomale GTPase Ypt7/Rab7 rekrutiert wird (Wurmser *et al.*, 2000). Der Kernkomplex wird durch die VPS-Klasse C Proteine VPS11, VPS16, VPS18 und VPS33 gebildet (Rieder und Emr 1997), zu dem noch die Untereinheiten VPS6 und VPS41 hinzukommen. Der Kernkomplex ist allerdings zusammen mit VPS3 und VPS8 auch Teil des CORVET-Komplexes, der vermutlich das Tethering durch Rab5 vermittelt (Peplowska *et al.*, 2007). *In vivo* ist diese Funktion allerdings noch nicht nachgewiesen worden. Zudem gibt es in *T. brucei* kein offensichtliches orthologes Protein zu dem spezifisch im CORVET-Komplex beteiligten Protein VPS8.

Um die Beteiligung der beiden Tethering-Komplexe an dem Transport von EP1:GFP nachzuweisen wurden die orthologen Sequenzen in *T. brucei* durch BLAST-Analyse gesucht (Abb. 52A). Hierdurch konnten die wahrscheinlichen Untereinheiten *TbVPS33* (Tb927.3.2280), *TbVPS18* (Tb11.47.0033) und *TbVPS11* (Tb927.8.7200) identifiziert werden, die Identifizierung von *TbVPS16* ist durch BLAST-Suche alleine nicht möglich. *Tbvps11* (Tb927.8.7200) wurde ausgehend von der humanen Sequenz (NP\_068375) mit einer Wahrscheinlichkeit von  $8,9 \times 10^{-21}$  ermittelt und als Zielsequenz ausgewählt. Der Vergleich dieser Sequenz mit der humanen Datenbank führte wiederum zu *HsVPS11* als einziges orthologes humanes Protein ( $5 \times 10^{-78}$ ). Der Vergleich der Ergebnisse der SMART-

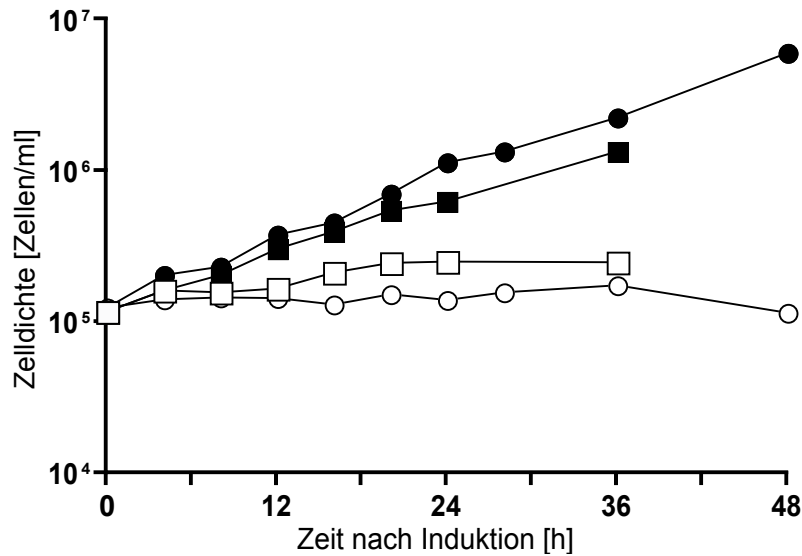


**Abb. 52: *In silico*-Identifizierung von *TbVPS11*:** A) Auflistung der Ergebnisse der BLAST-Suche mit den niedrigsten E-Werten. B) Schematische Wiedergabe der vergleichenden SMART-Analyse. 4 $\beta$ -Domäne kennzeichnet die 4-strängigen  $\beta$ -Faltblattmotive, die beim humanen Protein aus sieben mändrierenden Motiven besteht und bei dem Protein aus *T. brucei* aus sechs Motiven. Das graue Rechteck kennzeichnet die *coiled coil*-Domäne, während das Dreieck die Position der RING-Domäne markiert. C) Übersicht über das zur RNA-Interferenz gewählte Fragment von *TbVPS11*.

Analysen ergab als übereinstimmende Domänen eine *coiled coil* Domäne zwischen den AS 930 und 960 (human: AS 775 und 813) und eine RING-Finger-Domäne zwischen den AS 975 und 1009 (human: AS 822 bis 860). Allerdings zeigt die Analyse der humanen Sequenz eine Anzahl  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen auf, die im orthologen *TbVPS11* nicht zu finden sind. Im trypanosomalen Protein liegt hingegen eine kürzere Domäne mit siebenblättrigen viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern vor, was auf eine Phosphotriesterasefaltung hindeuten würde (Abb. 52B).

Als Zielsequenz für die RNAi wurde die Nukleotide 2065 bis 2865 (entspricht den AS 689 bis 955) ausgewählt und mit den Primern VPS11\_HindIII\_U1 und VPS11\_BamHI\_L1 auf Grundlage der genomischen DNA von AnTat1.1 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Hind* III und *Bam*H I behandelt und anschließend mit dem ebenso behandelten Vektor pBSK ligiert. Nach Bestätigung des Inserts durch Sequenzierung wurde das Fragment wieder durch dieselben Enzyme hergestellt und in p2T7 ligiert. Die Sequenzierung wies die abweichende Aminosäuresequenz (T358A) durch die Nukleotidänderung (a1072g) zwischen den Sequenzen von AnTat1.1 und TREU927 nach.

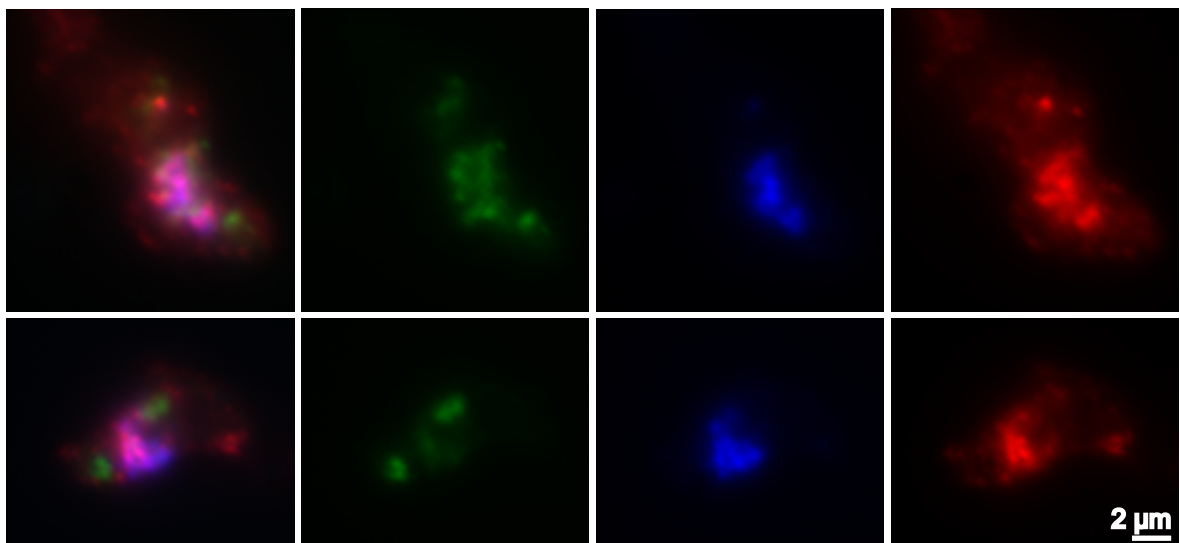
Von zehn Transfektionen führten vier zu resistenten Zellen, wobei alle erhaltenen Zelllinien auf Tetrazyklininduktion reagierten. Die Zellen wiesen sofort nach Induktion eine deutliche Reaktion im Wachstumsverhalten auf und wiesen bereits 4 h nach Induktion ein deutlich reduziertes und später kein nennenswertes Populationswachstum mehr auf. Erst nach



**Abb. 53: RNA-Interferenz gegen *TbVPS11*:** Wachstum von M1.2<sup>tetR.VPS11</sup><sub>K.EG</sub> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

etwa 40 h Induktion begann die Kultur abzusterben, so dass nach 72 h keine lebenden Zellen mehr nachweisbar waren. Abbildung 53 zeigt das detaillierte Wachstumsverhalten über die ersten 48 Stunden nach Induktion.

Durch Immunofluoreszenz wurde die Lokalisation von EP1:GFP nach Herunterregulation von VPS11 untersucht. Nach 16 h Induktion ist deutlich zu erkennen, dass das Lysosom an Integrität verliert (Abb. 54). In nichtinduzierten Zellen markiert das lysosomale Protein p67 (Alexander *et al.*, 2002) das einzelne, runde Lysosom. Rab7 konzentriert sich an einigen Punkten nahe dem Lysosom, die ebenfalls EP1:GFP beinhalten. Darüberhinaus nimmt EP1:GFP deutlich den Bereich zwischen Flagellartasche und Lysosom ein. Die induzierten Zellen hingegen weisen ein vergrößertes, unregelmäßiges, möglicherweise fragmentarisches



**Abb. 54: Lokalisation von EP1:GFP nach *knock down* von *TbVPS11*:** EP1:GFP akkumuliert nahe dem spätendosomalen Kompartiment nahe dem Lysosom. Blau: *TbP67* (Lysosom), Rot: *TbRab7* (späte Endosomen), Grün: EP1:GFP.



Lysosom auf, welches auf die Beeinträchtigung der Zellteilung zurückzuführen sein könnte. Das spätendosomale Kompartiment mit Rab7 ist nahe dem Lysosom. In Bezug auf EP1:GFP ist zu beobachten, dass kaum noch Kolo-kalisation von EP1:GFP mit Rab7 stattfindet. Die Bereiche von Lysosom und späten Endosomen weisen keine nennenswerte GFP-Fluoreszenz auf. EP1:EGFP verteilt sich viel mehr über den posterioren Bereich der Zelle, wobei sich nur ein Teil des Fusionsproteins zwischen Flagellartasche und Lysosom befindet. In vielen Fällen befindet sich ein Teil der Fusionsproteine zwischen Zellkern und Lysosom, so dass sich EP1:GFP an zwei Punkten in der Zelle konzentriert.

#### **4.2.2.5. Das Retromer ist am Transportweg von GPI-verankerten Proteinen beteiligt**

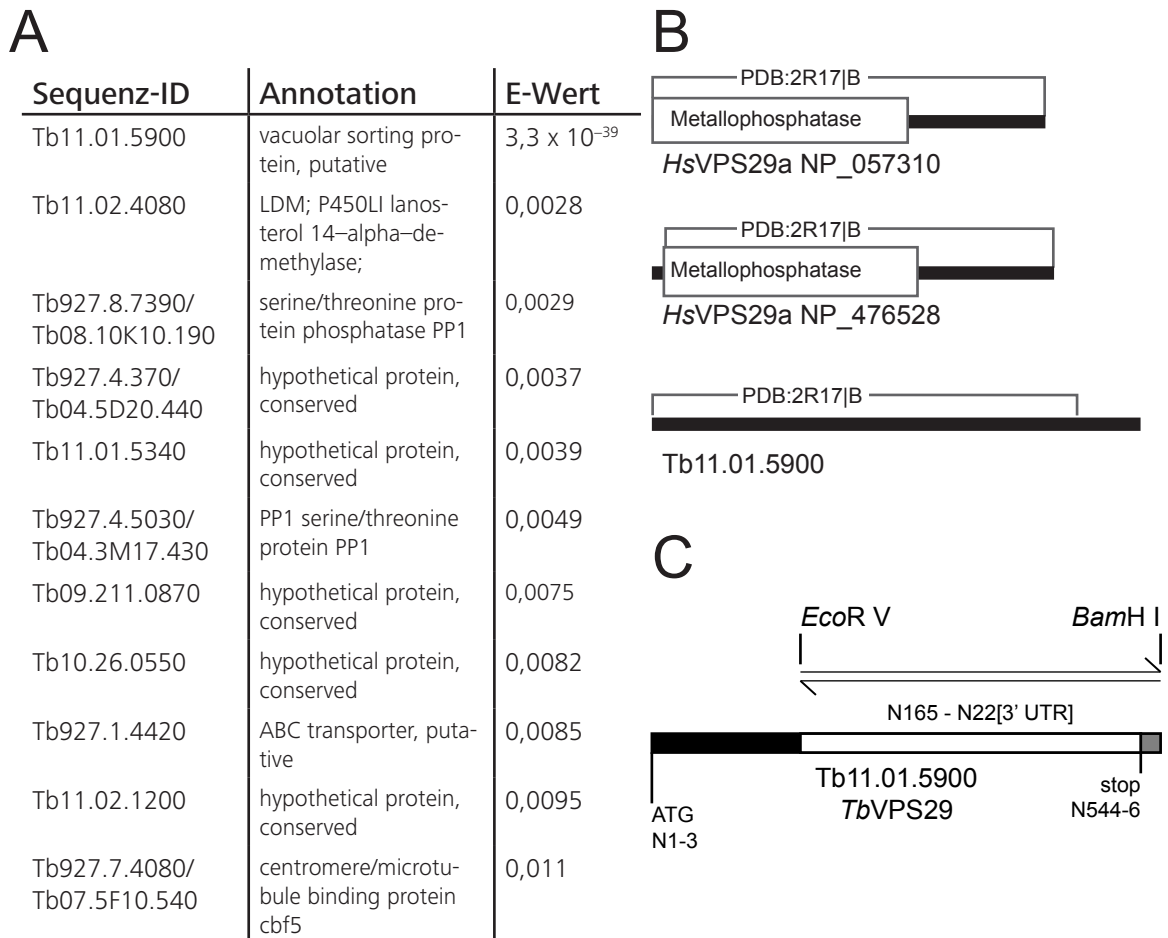
In Säugerzellen und in der Hefe dient das Retromer primär zum Rezykeln von Rezeptoren aus dem endosomalen Kompartiment (Kornfeld 1992; Cooper und Stevens 1996). Hierbei werden die besetzten Mannose-6-Phosphat- bzw. Carboxypeptidase Y-Rezeptoren vom *trans*-Golgi-Apparat zum endosomalen Kompartiment transportiert. Der Rücktransport der unbesetzten Rezeptoren erfolgt durch das Retromer.

Das Retromer selbst wird durch 5 Untereinheiten gebildet. Die in Hefe und Säugerzellen charakterisierte Struktur setzt sich aus dem Rekrutierungskomplex (*endosome recruiting complex*) und dem Erkennungskomplex (*cargo recognition complex*) zusammen. Der erste besteht aus einem Dimer von zwei sortierenden Nexinen. In der Hefe wird dieses Dimer aus den Proteinen ScVPS5 und ScVPS15 gebildet (Rojas *et al.*, 2007), in Säugerzellen aus Kombinationen der Nexine SNX1, SNX2, SNX5 und SNX6 (Wassmer *et al.*, 2007). Dieses Dimer ist an der Bildung der tubulären Vesikel beteiligt und für die Rekrutierung des Erkennungskomplexes an die Endosomen zuständig. Dieser Erkennungskomplex besteht aus den Proteinen VSP26, VPS29 und VPS35 und bindet an die zytosolischen Domänen der Rezeptoren, welche durch das Retromer zurück zum Golgi-Apparat transportiert werden. Diese drei Strukturproteine sind innerhalb der eukaryotischen Domäne konserviert, wobei die genauen Abläufe nach wie vor unklar sind. Insbesondere gibt es einige signifikante Unterschiede zwischen den Beobachtungen in Säugerzellen und in der Hefe.

In Säugerzellen werden die beiden Mannose-6-Phosphatrezeptoren in frühen Endosomen durch ScVPS35 gebunden. In der Hefe hingegen wird der Carboxypeptidase Y-Rezeptor VPS10/PEP1 in späten Endosomen durch ScVPS35 erkannt und zum *late Golgi* zurücktransportiert (zusammengefasst in Seaman, 2006). Bemerkenswert ist allerdings, dass weder Mannose-6-Phosphatrezeptoren noch VPS10 in *T. brucei* nachgewiesen werden konnten. Deshalb sollte überprüft werden, ob das Retromer in *T. brucei* bei dem Transport von GPI-verankerten Proteinen beteiligt ist.

Als Grundlage diente die Sequenzen der Komponenten des humanen Retromerkomplexes HsVPS26 (NP\_001030337), HsVPS29 (NP\_057310) und HsVPS35 (NP\_060676). Die BLAST-

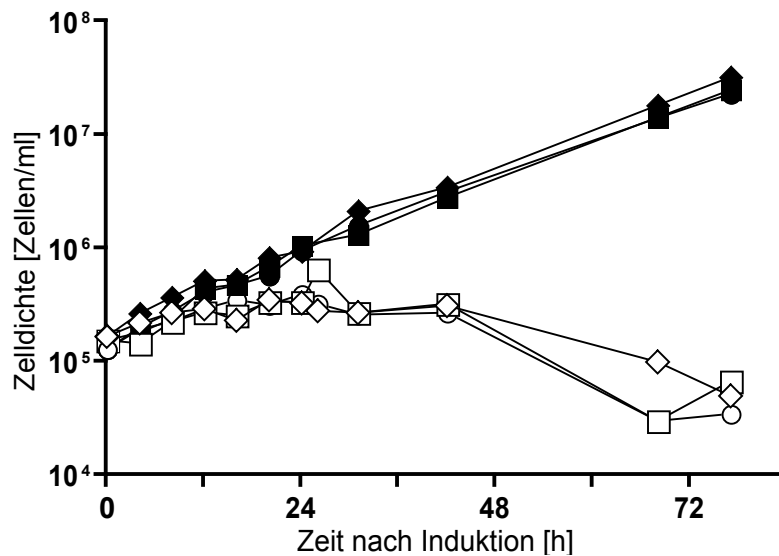




**Abb. 55: *In silico*-Identifizierung von *TbVPS29*:** A) Auflistung der Ergebnisse der BLAST-Suche mit den niedrigsten E-Werten. B) Schematische Wiedergabe der vergleichenden SMART-Analyse. Die übereinstimmende, für VPS29 typische Domäne 2R17|B ist durch die Klammer dargestellt, die Metallophosphatasefaltung innerhalb dieser Domäne durch das Rechteck. C) Übersicht über das zur RNA-Interferenz gewählte Fragment von VPS29.

Analyse mit den Sequenzen aller drei direkt an der Sortierung beteiligter Proteine (*HsVPS26*, *HsVPS29* und *HsVPS35*) führte zu den orthologen Sequenzen *TbVPS26* (Tb11.01.1770; E-Wert  $1,1 \times 10^{-22}$ ), *TbVPS29* (Tb11.01.5900; E-Wert  $3,3 \times 10^{-39}$ ) und *TbVPS35* (Tb10.70.5460; E-Wert  $8,6 \times 10^{-63}$ ).

*TbVPS29* wurde als Zielsequenz für die RNA-Interferenz ausgewählt. *TbVPS29* ist größer als das orthologe humane Protein (226 AS gegenüber 182 AS) und weist am C-Terminus eine Folge von 6 Prolinen und einem Glutamat aus, die beim humanen Protein nicht auftauchen. Um die Identifizierung zu untermauern wurde *TbVPS29* auch mit dem orthologen Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ScVPS29*; NP\_011876) verglichen. *ScVPS29* ist mit 282 AS wesentlich länger als beide anderen Proteine. Die SMART-Analyse aller drei Proteine ergab eine identische Domäne (PDB:2R17|B) am N-Terminus (Abb. 55). Diese Domäne weist in allen drei Proteinen mit  $1,0 \times 10^{-104}$  (*Hs*),  $1,0 \times 10^{-103}$  (*Sc*) und  $1,0 \times 10^{-40}$  (*Tb*) die signifikantesten E-Werte auf, obwohl die trypanosomale Sequenz auch hier die höchste Abweichung zeigt.



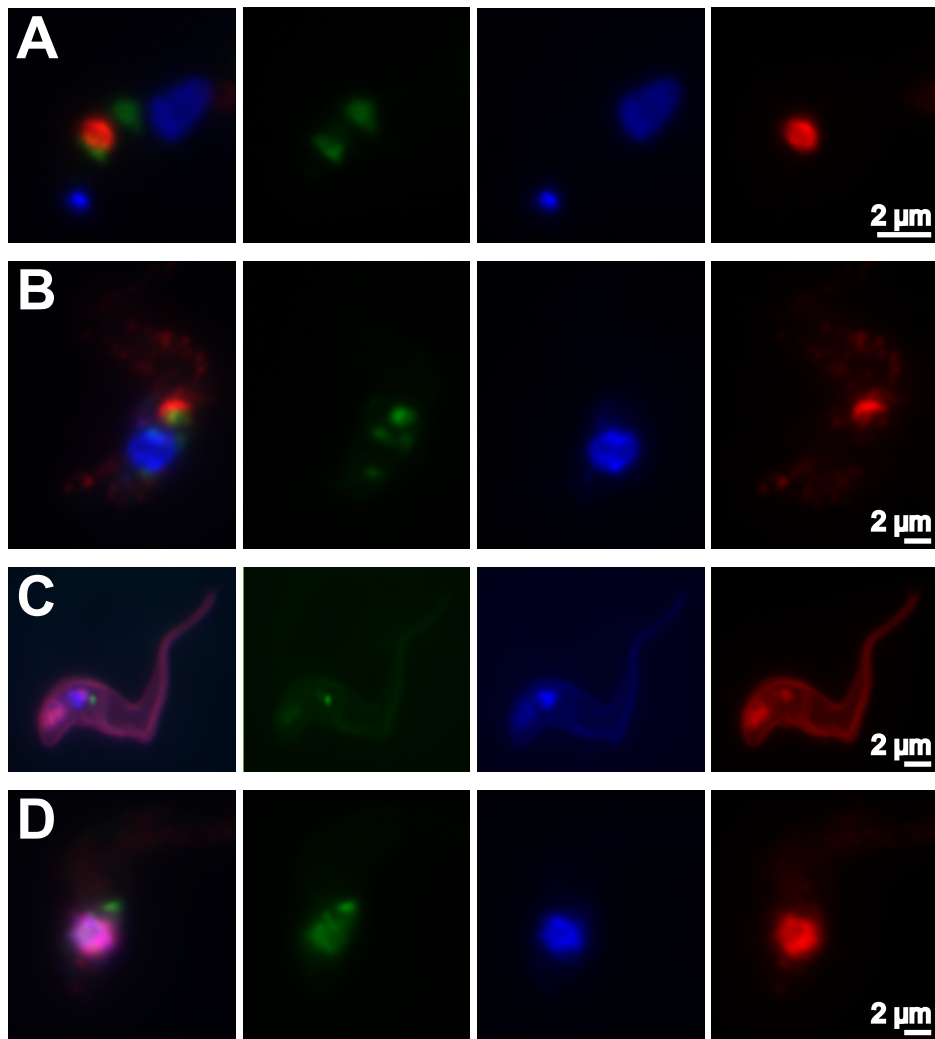
**Abb. 56: RNA-Interferenz gegen *TbVPS29*:** Wachstum von M1.2<sup>tetR.VPS29<sub>K.EG</sub></sup> nach Induktion der RNA-Interferenz. Die offenen Symbole stehen für die mit Tetrazyklin versehene Kulturen, die geschlossenen Symbole für die unbeeinflusste Kulturen.

Beide humane Proteine umfassen außerdem noch eine Metallophosphatasedomäne mit den AS 1-119 (Isoform 1) bzw. AS 5-123 (Isoform 2) (Hierro *et al.*, 2007). Allerdings ist keine Aktivität nachweisbar, da die katalytisch entscheidende Aminosäure H63 zu P63 mutiert ist. Laut dem Sequenzabgleich trifft dies auch auf *TbVPS29* zu. Die E-Werte dieser Pfam-Domänen liegen bei  $6,5 \times 10^{-12}$  bzw.  $1,1 \times 10^{-10}$ . Hinzu kommen bei allen drei Proteinen unterschiedliche SCOP-Domänen am C-Terminus, die allerdings keinen signifikanten E-Wert aufwiesen (min.  $5 \times 10^{-5}$ ) und deshalb vernachlässigt wurden.

Für die RNA-Interferenz wurde ein Fragment entsprechend der Nukleotide 31 bis 532 des offenen Leserasters. Das DNA-Fragment wurde mittels PCR durch die Primer VPS29\_EcoRV\_U1 und VPS29\_BamHI\_L1 aus dem Genom von AnTat1.1 amplifiziert und in den Vektor pBSK mittels der angefügten Restriktionsstellen für *EcoR* V und *BamH* I ligiert. Das Plasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft und das Fragment des offenen Leserasters wies gegenüber der Sequenz Tb11.01.5900 zwei stille Mutationen auf (C285T und G288C). Anschließend wurde das Fragment mit dem mittels *Hind* III und *BamH* I linearisierten Vektor pT7 ligiert.

Das linearisierte Plasmid pT7.VSP29 wurde in die Zelllinie M1.2<sup>tet<sub>K.EG</sub></sup> transfiziert. Zu höheren Effizienz wurde das Elektroporationsgerät AMAXA mit dem Elektroporationspuffer Cytomix verwendet. Von den resultierenden Zelllinien wurden drei unabhängige Klone anhand ihrer Reaktion auf Tetrazyklin ausgewählt und das Populationswachstum nach Tetrazyklininduktion beobachtet.

Die induzierten Zellen zeigten schon nach 4 h eine Wachstumsverzögerung. Nach etwa 12 h erreichten die induzierten Kulturen ihre maximale Zelldichte, die über einen Zeitraum von etwa 28 h konstant blieb (Abb. 56). Nach dieser Zeit nahm die Populationsdichte immer mehr ab bis keine lebenden Zellen mehr nachweisbar waren. Im Verlauf der Inkubationszeit



**Abb. 57: Lokalisation von EP1:GFP nach RNA-Interferenz gegen *TbVPS29*:** A) EP1:GFP akkumuliert nicht nur am Lysosom, sondern auch an einem zweiten Punkt nahe dem Zellkern. B) EP1:GFP akkumuliert bei Interferenz gegen *TbVPS29* nahe dem Golgi-Apparat. Blau: DAPI (Nukleus und Kinetoplast), Rot: *TbRab31* (Golgi-Apparat), Grün: EP1:GFP. C) Endozytiertes VSG ist nicht mit EP1:GFP colokalisiert. Blau: *Tbp67* (Lysosom), Rot: Streptavidin (VSG), Grün: EP1:GFP. D) EP1:GFP akkumuliert nicht im spätendosomalen Kompartiment. Blau: *Tbp67* (Lysosom), Rot: *TbRab7* (späte Endosomen), Grün: EP1:GFP.

sahen die Zellen zunehmend deformierter aus. Die meisten Zellen wurden unförmiger und rundeten sich leicht ab. Vereinzelt konnte man stark vergrößerte Flagellartaschen und Zellaggregate beobachten.

EP1:GFP konzentrierte sich nach 17 h Induktion in einem konkreten Areal nahe dem Lysosom sowie in geringerem Maß auch um das Lysosom herum. Im Unterschied zu der Kontrollpopulation befanden sich zudem EP1:GFP-positiven Strukturen zwischen Nukleus und Lysosom. Nur in Ausnahmefällen war Fluoreszenz nahe der Flagellartasche zu sehen. Zur Analyse wurde die Lokalisation von EP1:GFP mit der von endozytiertem VSG verglichen. Abbildung 57 zeigt die Lokalisation von biotinyliertem VSG im Vergleich zu EP1:GFP. Hier ist eine starke Segregation zwischen endozytiertem VSG und EP1:GFP zu beobachten. VSG

wird endozytiert und zum Lysosom transportiert, während EP1:GFP zum größten Teil auf der anderen Seite des Lysosoms lokalisiert ist. Die verringerte Colokalisation mit *TbRab7* bestätigt, dass die EP1:GFP nur zu einem Teil noch in den späten Endosomen vorliegt und dass die Konzentration von EP1:GFP zum Zellkern hin keine spätendosomale Struktur ist. Da das Retromer in Säugerzellen an dem Rücktransport zum Golgi-Apparat beteiligt ist, wurde auch die Lokalisation in Bezug auf den Golgi-Apparat überprüft. Die Färbung des Golgi-Apparates durch *TbRab31*-Antikörper zeigte deutlich die Nähe zwischen EP1:GFP und dem Golgi-Apparat nach Induktion der RNAi. EP1:GFP sammelt sich direkt zwischen den beiden Organellen sehr nahe am Golgi an (Abb. 57). Diese Lokalisation zeigt deutlich, dass das Fehlen des VPS26-29-35-Komplexes in *T. brucei* nicht nur eine Trennung von EP1:GFP und VSG bewirkt, sondern dass auch die Fusion der Retromervesikel mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk beeinträchtigt ist. Auf welcher molekularen Basis die GPI-verankerten Proteine voneinander getrennt werden und ob die Tertiärstruktur des Proteins, das Vorliegen als Monomer respektive Dimer oder die Valenz der GPI-Verankerung hier entscheidend ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht näher spezifiziert werden.

#### **4.3. Transport von GPI-verankerten Proteinen in pleomorphen Trypanosomen**

Die vorangegangenen Experimente fanden ausschließlich in dem Blutstromstamm M1.2 statt. Dieser Stamm ist durch kontinuierliche Kultivierung in Versuchstieren adaptiert und gehört zu den monomorphen Trypanosomenstämmen, welche kein *short stumpy*-Stadium ausbilden. Das *short stumpy*-Lebensstadium wird übersprungen und die Zellen transformieren unter den entsprechenden Bedingungen direkt zu prozyklischen Trypanosomen.

Pleomorphe Trypanosomen wie der Stamm AnTat 1.1 hingegen bildet beide Blutstromstadien aus, ist allerdings nicht in vitro kultivierbar. Aus diesem Grund ist die Infektion von Nagern unabdingbar. Während sich bestimmte Fragestellungen aufgrund der leichteren Kultivierbarkeit besser mit monomorphen Zelllinien beantworten lassen, sind andere gar nicht zugänglich. Insbesondere die Beschreibung des *short stumpy*-Stadiums erfordert die Arbeit mit pleomorphen Trypanosomen.

Während der Transformation werden die Zellarchitektur und der Stoffwechsel grundlegend verändert, das Mitochondrium wird aktiviert und vergrößert und statt der ausschließlichen Umsetzung von Glukose zu Pyruvat dient der Abbau von Prolin zur Energiegewinnung. Während des *short stumpy*-Lebensstadiums präadaptieren sich die Zellen und bereiten die Transformation vor. Um diese Präadaption in Bezug auf den Transport von GPI-verankerten Proteinen zu untersuchen, wurden die in Kapitel 4.1 geschilderten Versuche auf die Zelllinie AnTat1.1 (A1.1) übertragen. Da diese Zelllinie die pleomorph ist und somit sowohl das *short stumpy* als auch das prozyklische Lebensstadium ausbildet, wurden die Untersuchung des Transportes von GPI-verankerten Proteinen in *short stumpy*-Zellen so ermöglicht.

#### 4.3.1. Herstellung einer pleomorphen induzierbaren Zelllinie

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von GPI-verankerten Proteinen in A1.1 musste zunächst eine geeignete Zelllinie hergestellt werden. Die Nutzung von RNAi setzt ein induzierbares System in der jeweiligen Zelllinie voraus. Deshalb wurde das tetrazyklininduzierbare System auf die pleomorphe Zelllinie A1.1 übertragen. Grundlage bildeten hier die Vektoren pLew90 (L90) und pLew13 (L13) (Wirtz *et al.*, 1999).

Zunächst wurde das Gen zur Expression des Tetrazyklinrepressors in die Zelllinie A1.1 transfiziert. Hierzu wurde der Vektor pLew90 (L90) nach Linearisierung mit *Not* I genutzt. Nach Vermehrung der Trypanosomen in immunsupprimierten Versuchstieren wurden drei Transfektionen durchgeführt und die Zellen anschließend *in vitro* in HMI9-Methylcellulose kultiviert. Alle drei Transfektionen ergaben nach Selektion mit 1 µg Hygromycin die Populationen A1.1<sub>L90</sub> #1-3. Zur Überprüfung der Expression des Tetrazyklinrepressors wurden die drei Populationen mit dem Vektor pLew20 (L20) transfiziert, welcher das Gen für die Luciferase als Reporter beinhaltet (Wirtz *et al.*, 1999). Die Expression der Luciferase und des Phleomycin-bindenden Proteins findet in diesem Vektor durch einen unter der Regulation zweier Tetrazyklin-Operatoren stehenden Prozyklinpromotor statt. Dies ermöglichte die Überprüfung der Regulation durch den Tetrazyklinrepressor sowohl anhand der Expression der Luciferase wie auch des Phleomycin-bindenden Proteins.

Nur die Transfektionen der Populationen #2 und #3 führten zu den rekombinanten Populationen A1.1<sub>L90</sub><sup>L20</sup>.

Zur Überprüfung der Phleomycinresistenz in Abwesenheit von Tetrazyklin wurden beide Populationen mit Phleomycin und mit bzw. ohne Tetrazyklin auf Agaroseplatten kultiviert.

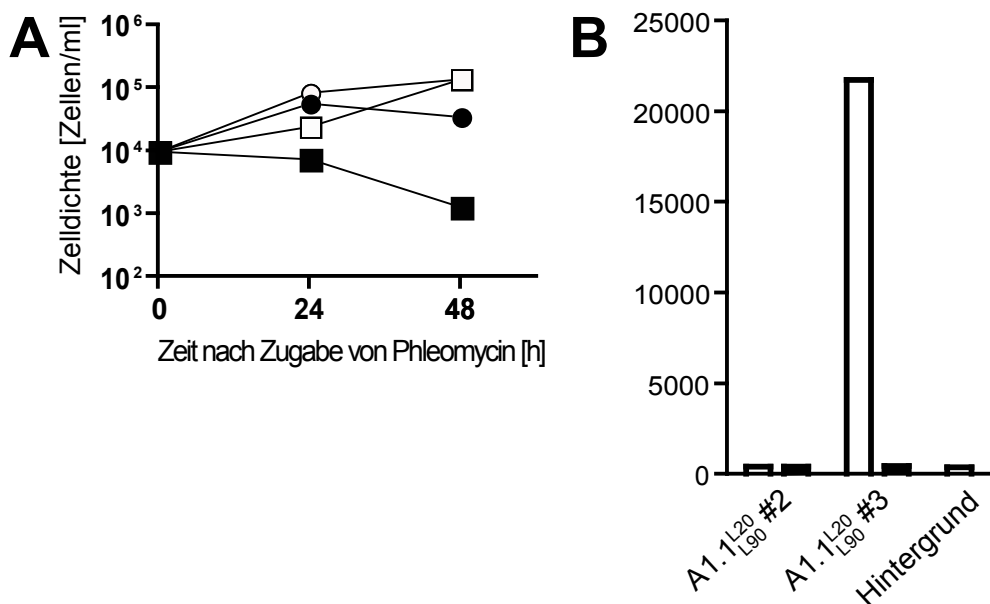


Abb. 58: Regulation der Expression durch den Tetrazyklinrepressor in den Zelllinien A1.1<sub>L90</sub>: A) Wachstumsverhalten der Populationen mit und ohne Tetrazyklin. B) Messung der Luciferaseaktivität in den Zelllinien A1.1<sub>L90</sub><sup>L20</sup>. Die geschlossenen Symbole stellen die Werte ohne Tetrazyklin, die offenen Symbole die mit Tetrazyklin dar.

Abbildung 58A stellt das Wachstumsverhalten der beiden Populationen mit und ohne Tetrazyklin dar. Bei beiden Populationen zeigte sich in Abwesenheit von Tetrazyklin eine Beeinträchtigung des Populationswachstums, welche im Fall der Population #3 allerdings stärker beobachtbar war.

Das Expressionsniveau der Luciferase wurde nach Kultivierung beider Populationen auf Agaroseplatten mit und ohne Tetrazyklin durch Lyse der Zellen und anschließender Bestimmung der Luciferase-Aktivität gemessen. Abbildung 58B zeigt die Ergebnisse dieser Messung. Während die Population #2 keine durch Tetrazyklin erhöhte Expression der Luciferase aufwies, konnte bei Population #3 eine sehr starke Regulation festgestellt werden. Deshalb wurde weiterhin mit Population #3 als der Zelllinie A1.1<sub>L90</sub> gearbeitet.

Vor der Transfektion mit dem Vektor pLew13 wurden die pleomorphen Trypanosomen in einen immunsupprimierten Nager injiziert und so eine genügende Zellanzahl erreicht. Nach der Transfektion wurden die Zellen *in vitro* in HMI9-Methylcellulose unter Selektion von 2 µg/ml G418 kultiviert. Bis 22 Tage nach Transfektion konnten in allen zehn Ansätzen überlebende Trypanosomen festgestellt werden, die allerdings zum Teil eine sehr niedrige Wachstumsrate aufwiesen. Die einzelnen Populationen von A1.1<sub>L20</sub><sup>L90</sup> (A1.1<sup>tet</sup>) wurden bei einer Zelldichte zwischen  $1 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  z/ml eingefroren.

Zunächst wurden zufällig vier Kulturen ausgewählt und nach der Kultivierung in Ratten mit dem induzierbaren Vektor pLew82.VSG'Y' induziert. Im Gegensatz zu dem Nachweis der Luciferase lässt sich VSG'Y' sehr einfach in lebenden Zellen nachweisen, so dass schnell und unkompliziert festgestellt werden konnte, ob die Zelllinien eine Expression durch die T7-RNA-Polymerase aufwiesen. Von vier Kulturen, die mit pLew82.VSG'Y' transfiziert wurden, ergaben die drei Zelllinien #6, #7 und #9 resistente Linien A1.1<sup>tet</sup> L82.VY. Nach Vermehrung der Trypanosomen in Versuchstieren wurde die induzierbare Expression von VSG'Y' überprüft. Die Zelllinien #7 und #9 zeigten nach 24 h Induktion eine starke VSG'Y' Fluoreszenz, während die Kulturen ohne Tetrazyklin keine sichtbare Fluoreszenz aufwiesen.

Durch Immunofluoreszenz wurde jedoch festgestellt dass die Zelllinie #9 mittlerweile ein anderes VSG als AnTat1.1 exprimierte. Aus diesem Grund wurde auf die Zelllinie #7 zurückgegriffen, die für weitere Transfektionen genutzt wurde. Die starke Regulation in der Zelllinie A1.1<sup>tet</sup> #7 ist in den Arbeiten von Kooperationspartnern auch bereits mehrfach genutzt und bestätigt worden (Dean *et al.*, 2009).

#### **4.3.2. Konstitutive Expression von fluoreszierenden Proteinen in pleomorphen Trypanosomen**

Zur Untersuchung der Transportwege von GPI-verankerten Proteinen in pleomorphen Trypanosomen wurden Zelllinien hergestellt, die durch fluoreszierende Proteine eine Analyse ermöglichen sollten. Der in der monomorphen Zelllinie M1.2 genutzte Vektor pKD4 ist



für A1.1 nicht geeignet, da in A1.1 eine andere *expression site* exprimiert wird. Demnach sind als konstitutive Vektoren vor allem die Varianten des pTSAr**ib** geeignet, um eine konstitutive Expression im Blutstromstadium zu ermöglichen.

#### **4.3.2.1. Expression von VSG'Y' in pleomorphen Trypanosomen**

Zunächst sollte ein weiteres VSG von den pleomorphen Trypanosomen exprimiert werden um so die Oberfläche bei lebenden Zellen zu markieren. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pTSAr**ib**(blas).VSG'Y' (siehe Kap. 4.1.5) ausgewählt.

Die induzierbare Zelllinie A1.1<sup>tet</sup> wurde mit beiden Konstrukten transfiziert. Die Transfektion mittels pTSAr**ib**(blas).VSG'Y' ergab in drei von acht Ansätzen lebende und fluoreszierende Zelllinien A1.1<sup>tet</sup><sub>Tb.VY</sub>. VSG'Y' wurde in allen drei Zelllinien exprimiert, so dass nun eine pleomorphe Zelllinie mit VSG'Y' zu Untersuchung des Traffickings von GPI-verankerten Proteinen in *short stumpy*-Trypanosomen zur Verfügung steht.

#### **4.3.2.2. Expression von EP1:GFP in pleomorphen Trypanosomen**

Zunächst wurden die Proteine EP1:GFP und VSG'Y' in der Zelllinie A1.1 exprimiert, um die Lokalisation dieser Proteine im SS Lebensstadium zu untersuchen. Hierzu wurde die mit dem Vektor pGaprone(neo).EP1:GFP transfizierte Zelllinie A1.1<sup>Gn.EG</sup> (AnTat 1.1 pG-LII. EG) ausgewählt, welche bereits vorlag (Engstler und Boshart 2004).

pGaprone(neo).EP1:GFP führt zur Expression von EP1:GFP aus dem Prozyklin-Lokus. Dies ermöglicht die Expression durch Senkung der Kultivierungstemperatur auf 23 °C, da die Transkription des Prozyklin-Lokus bei dieser Temperatur stark ansteigt (Engstler und Boshart 2004).

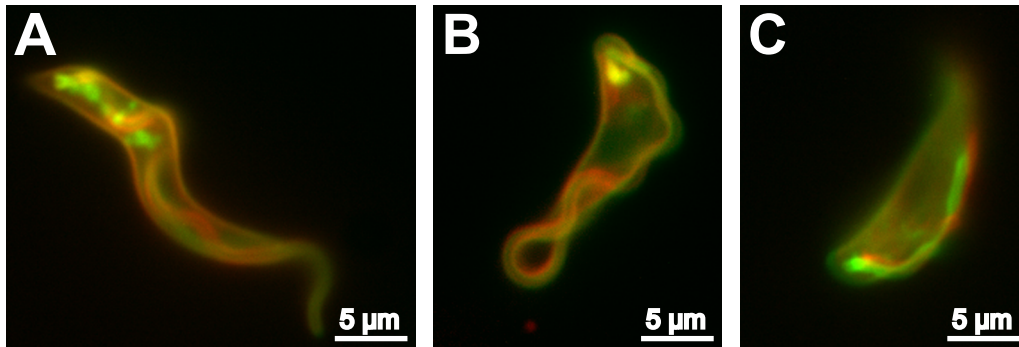
Die Zelllinie A1.1<sup>Gn.EG</sup> wurde mit dem Vektor pTSAr**ib**(hyg).VSG'Y' transfiziert. Acht von zehn Transfektionen führten zu lebenden Zelllinien A1.1<sup>Gn.EG</sup><sub>Th.VY</sub>, die auch alle eine deutliche Fluoreszenz durch VSG'Y' aufwiesen.

Um die Lokalisation der fluoreszierenden Proteine in *short stumpy*-Trypanosomen zu untersuchen wurden 5 × 10<sup>4</sup> Zellen auf HMI9-Agarose Platten kultiviert. Drei Tage später wurden die Trypanosomen abgewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 59). Im Gegensatz zu der Lokalisation von EP1:GFP in den Endosomen in *long slender*-Zellen sind EP1:GFP und VSG'Y' zusammen auf der pellikularen Zelloberfläche von *short stumpy* BSF colokalisiert.

#### **4.3.2.3. Herstellung einer induzierbaren pleomorphen Reporterzelllinie**

In Kapitel 4.1.4.1 ist die Herstellung des Vektors pTSAr**ib**(blas).EP1:YFP beschrieben. Dieser Vektor wurde nun dazu benutzt, um die Expression von EP1:YFP in pleomorphen Trypanosomen zu ermöglichen.





**Abb. 59: Die gleichzeitige Expression von EP1:GFP und VSG'Y' in einer pleomorphen Zelllinie:** A-C) Die Abbildungen zeigen die pleomorphen Trypanosomen in den unterschiedlichen Lebensstadien von *long slender* (A) und *short stumpy* (C). Während in *long slender*-Zellen EP1:GFP im Zellinnern detektierbar ist, die äußere Zellmembran aber keine Fluoreszenz aufweist, ist im *short stumpy*-Lebensstadium die Colokalisation von EP1:GFP mit VSG'Y' auf der äußeren Zelloberfläche feststellbar. Grün: EP1:GFP, Rot: VSG'Y'.

Bei der Transfektion von A1.1<sup>tet</sup> mit pTSAr(blas).EP1:YFP führten sieben Ansätze zu nur einer überlebenden Zelllinie. Bereits vorhergehende Experimente mit dem Vektor pTSAr(b(hyg)).EP1:GFP und der Zelllinie A1.1 hatten zu keinen rekombinanten Zelllinien geführt, so dass diese niedrige Transfektionseffizienz ein Hinweis auf eine mögliche Toxizität von EP1:GFP für die pleomorphe Zelllinie gesehen werden kann.

Die resultierende Zelllinie A1.1<sup>tet<sub>Tb.EY</sub></sup> ermöglicht die tetrazyklininduzierte Expression bei gleichzeitiger Expression von EP1:YFP.

#### 4.3.4. Expression des trunkierten VSG117:GFP in pleomorphen Trypanosomen

Das Fusionsprotein tVSG:GFP weist eine ähnliche Lokalisation in monomorphen Trypanosomen auf wie EP1:GFP, wobei eine wesentlich deutlichere Lokalisation im ER zu beobachten ist. Dennoch bietet sich auch dieses Protein an, um das Trafficking von GPI-verankerten Protein in *short stumpy* BSF zu untersuchen, da es im Gegensatz zu EP1:GFP durch zwei GPI-Anker an die Membran gebunden ist und somit eine andere Lokalisation aufweisen könnte.

Der Vektor pKD4 beschränkt den Einsatz von tVSG117:GFP auf MITat1.2. Um diesem Umstand Abhilfe zu schaffen wurde der offene Leserahmen von tVSG117:GFP mit den Enzymen *Spe* I und *Cla* I aus dem Vektor pBSK.tVSG117:GFP ausgeschnitten und mit dem großen Klenow-Fragment behandelt. Als Expressionsvektor wurde zunächst pTSAr(b(hyg)) gewählt und nach dem Verdau mittels *Hind* III mit Klenow und CIP behandelt.

Mit dem durch *Sph* I linearisierten Vektor wurde die Zelllinie A1.1 in zehn Ansätzen transfiziert. Insgesamt fünf dieser Ansätze führten zu resistenten Zellen. Die Zelllinien wurden durch fortwährende Kultivierung ohne Verdünnung in HMI9-Mc zu *short stumpy*-Trypanosomen. Ein Vergleich der verdünnten LS Kulturen mit den SS Kulturen zeigte die

unveränderte Lokalisation von tVSG117:GFP im endoplasmatischen Retikulum in *short stumpy*-Trypanosomen.

#### **4.3.3. Induzierbare RNA-Interferenz in pleomorphen Trypanosomen**

Zur Anwendung von RNA-Interferenz in pleomorphen Trypanosomen wurde die Zelllinie A1.1<sup>tet</sup><sub>Tb,VY</sub> versuchsweise mit zwei RNAi-Vektoren transfiziert.

Zur Transfektion wurden die Vektoren p2T7.CLH und p2T7.VPS29 ausgewählt. p2T7.CLH führte in monomorphen Trypanosomen zu einem einfach detektierbaren und mittels VSG'Y' darstellbaren Phänotyp, während *TbVPS29* in das Recycling von VSG zur Zelloberfläche in Trypanosomen involviert ist, welches in *short stumpy*-Trypanosomen aufgrund der fehlenden Neusynthese von VSG anderen Bedingungen unterliegen könnte.

Die Transfektion mit beiden RNAi-Vektoren führte zu je einer lebenden Zelllinie. Da für eine detaillierte Analyse der Vergleich mehrerer Zelllinien notwendig ist, konnten aufgrund der aufwändigen Kultivierung von pleomorphen Trypanosomen diese Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die Herstellung mehrerer RNAi-Zelllinien sowie ihre Analyse im *short stumpy*-Lebensstadium ist somit einer der wichtigsten Punkte, an denen dieses Projekt weitergeführt werden sollte.

## 5. Diskussion

### 5.1. *In silico*-Identifizierung von Regulatoren des intrazellulären Transportsystems

Die *in silico*-Identifizierung von orthologen Zielproteinen in *T. brucei* durch BLAST- und SMART-Analysen kann keine ausgiebige biochemische Charakterisierung ersetzen, jedoch Hinweise auf Funktion und spezifische Unterschiede zu den vorliegenden orthologen Proteinen in Säuger- und Hefezellen liefern. Um die identifizierten Proteine als Orientierungspunkte zur Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Proteinen nutzen zu können, muss eine mögliche unterschiedliche Lokalisation im Vergleich zu den orthologen Proteinen in Säuger- oder Hefezellen berücksichtigt werden.

Einige Proteinfamilien in *T. brucei* sind bereits *in silico* bestimmt und phylogenetisch untersucht worden (Ackers *et al.*, 2005; Herman *et al.*, 2006). Die hier vorliegende Arbeit dient der Etablierung von *T. brucei* als Modellsystem und setzt hierzu die Daten einer *in silico*-Identifizierung in einem weitläufigen *in vivo*-Screening um. Durch das angewendete Screening-Verfahren konnte die Beteiligung verschiedener Proteine am Transport von GPI-verankerten Proteinen nachgewiesen werden.

*Kinetoplastidae* gehören zu den ältesten eigenständigen Ordnungen und weisen aufgrund dieser frühen Divergenz eine ganze Anzahl von Charakteristika auf, die in diesem Ausmaß in Säugerzellen oder in der Hefe nicht zu beobachten sind. Die hohe Expression der Oberflächenproteine ermöglichte beispielsweise die Entdeckung und Aufklärung der GPI-Verankerung von Proteinen (Ferguson *et al.*, 1985). Andererseits fehlen aber auch ganze Gruppen von Genen in dem Genom von *T. brucei* und somit auch ganze Transportwege. Als Beispiel sei hier der in *T. brucei* fehlende Mannose-6-Phosphatweg mit dem Mannose-6-Phosphatrezeptor bzw. VPS10/PEP1 genannt. Aufgrund des Fehlens von wichtigen Transportwegen besitzen alternative Wege in *T. brucei* eine Prävalenz, welche die Charakterisierung erleichtert. Auch in Bezug auf die molekularen Mechanismen gibt es mitunter deutliche Unterschiede zwischen *T. brucei* und den bekannten Säuger- und Hefemolekülen. Das Vorliegen von stark minimierten Grundformen in *T. brucei* gibt auch hier Gelegenheit, die Funktion im vereinfachten System zu untersuchen.

Diese frühe Trennung der Kinetoplastidae erschwert die Interpretation der Ergebnisse aus BLAST- und SMART-Analyse, obwohl die Algorithmen der SMART-Analyse zu den bis dato gebräuchlichsten und auch bestmöglichen *in silico*-Analysen gehören, die zur Charakterisierung einzelner Proteinsequenzen durchgeführt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine ganze Reihe von bislang nicht charakterisierten Proteinen in *T. brucei* mithilfe von *in silico*-Analysen identifiziert (Tabelle 11). Einige der Ergebnisse sind sehr eindeutig und übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten über orthologe Proteine von Säugern, andere weichen hiervon allerdings ab.

**Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit identifizierten und verwendeten Proteinsequenzen von *T. brucei*.** Die Angabe der Homologie beinhaltet die Sequenzhomologie zu der als *query*-Sequenz verwendeten humanen Proteinsequenz bei BLAST-Analyse

Proteine	% Homologie der Proteinsequenzen	Identifikation in <i>T. brucei</i>	Unterschiede nach SMART-Analyse
HSP60	52	Tb10.70.0430*	keine
saure Sphingomyelinase	16	Tb927.4.1110 $7,4 \times 10^{-16}$	SAP-Domäne
Bet3	41	Tb927.8.5030 $3,4 \times 10^{-32}$	keine
ERGIC	16	Tb11.02.1680 $2,8 \times 10^{-33}$	Transmembrandomäne / C-terminale AS-Sequenz
$\alpha$ COP	39	Tb927.4.450 $9,4 \times 10^{-156}$	Anzahl $\beta$ -Transducin-Wiederholungen
GEF2	9	Tb927.8.1840 $3 \times 10^{-23}$	keine
STT3	28	Tb927.4.890 $1,3 \times 10^{-68}$	Anzahl der Transmembrandomänen
CLH	38	Tb10.70.0830 0	keine
VPS11	27	Tb927.8.7200 $8,9 \times 10^{-21}$	$\beta$ -Transducin-Wiederholungen
VPS29	43	Tb11.01.5900 $3,3 \times 10^{-33}$	Metallophosphatasedomäne / C-terminale AS-Sequenz
Rab5A	<i>n.d.</i>	Tb10.389.0550**	<i>n.d.</i>
Rab5B	<i>n.d.</i>	Tb11.02.2160**	<i>n.d.</i>
Rab7	<i>n.d.</i>	Tb09.211.2330***	<i>n.d.</i>
Rab11	<i>n.d.</i>	Tb927.8.4330***	<i>n.d.</i>

\*Bringaud *et al.*, 1995; \*\*Pal *et al.*, 2002; \*\*\*Boshart *et al.*, nicht publiziert; \*\*\*Jeffries *et al.*, 2001

Die Ergebnisse der SMART-Analysen sind vor allem die Erkennung von Pfam-Familien und SCoP-Domänen. SCoP vergleicht die vermuteten Sekundärstrukturen auf Basis der PDB-Datenbank und klassifiziert die Proteinsequenzen anhand der Ausbildung von typischen Faltungen in Faltungen, Superfamilien und Familien. Zur Zeit werden 3902 SCoP-Familien unterschieden. Die Datenbank der Pfam-Domänen beruht auf mehrfachen Sequenzalignments und der Anwendung von *hidden Markov* Modellen (HMM). Anhand der Sequenzhomologien unter Abgleich der SCoP-Domänen wird die Zugehörigkeit der Proteinsequenzen zu einer der über 10.000 Pfam-A-Familien postuliert.

Gerade in Bezug auf Multiproteinkomplexe unterscheidet sich *T. brucei* zum Teil signifikant von den Säugerzellen und der Hefe. Beispielsweise weist der Oligosaccharyltransferasekomplex

vermutlich nur ein einzelnes orthologes Protein in *T. brucei* und in *L. major* (Hese *et al.*, 2008) auf.

Die Untereinheit *TbBet3* ist eine Untereinheit des TRAPP-Komplexes, der als Tethering-Komplex am Golgi-Apparat eine Rolle spielt (Cox *et al.*, 2007). Auf Basis der BLAST-Analysen wurde die für beide TRAPP-Komplexe essentielle Untereinheit *TbBet3* identifiziert und durch RNAi herunterreguliert.

Während der TRAPP I-Komplex der Hefe über sieben Untereinheiten verfügt, konnten homologe Sequenzen für nur fünf dieser Sequenzen in *T. brucei* ermittelt werden (Tabelle 12). Diese fünf trypanosomalen Sequenzen sind homolog zu *ScBet3*, *ScBet5*, *ScTrs20*, *HsTRAPP23* und *ScTrs31*, welche in *H. sapiens* den Sequenzen *HsTRAPPc1* bis *HsTRAPPc5* entsprechen. Die BLAST-Analyse mit den Sequenzen der weiteren Untereinheiten *ScTrs33/HsTRAPPc6* und *ScTrs85* führten zu keinen eindeutigen homologen Sequenzen.

Von den drei Untereinheiten, die für den Komplex II charakteristisch sind, ist *Trs65* ausschließlich in Pilzen und einigen wenigen Protozoen nachgewiesen worden (Cox *et*

**Tabelle 12: Übersicht über die *in silico*-identifizierbaren Untereinheiten der TRAPP-Komplexe**

Untereinheiten beider TRAPP-Komplexe	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. brucei</i>
TRAPPc1/Bet5	NP_067033	NP_013634.1	Tb09.211.3810 $7,9 \times 10^{-17}$
TRAPPc2/Trs20	a: NP_001011658.1 b: NP_001122307.1	NP_009813.1	Tb927.8.5900 $7,6 \times 10^{-12} - 2,4 \times 10^{-06}$
TRAPPc3/Bet3	NP_055223.1	NP_012994	Tb927.8.5030 $3,4 \times 10^{-32}$
TRAPPc4/Trs23	NP_057230.1	NP_010532	Tb11.01.7570 $6,9 \times 10^{-11}$
TRAPPc5/Trs31	NP_001035926	NP_010760	Tb09.211.3210 $5,9 \times 10^{-12}$
TRAPPc6/Trs33	NP_077013	NP_014758	–*
Trs85	–	NP_010393.1	–*
<b>TRAPP II spezifische Untereinheiten</b>			
TRAPPc9/Trs120	NP_113654	NP_010695	–*
TRAPPc10/Trs130	NP_003265	NP_013945	–*
Trs65	–	NP_011682	–*

\* keine eindeutige Zuordnung unter einem E-Wert von  $10^{-5}$  möglich

Die Identifizierungsnummern bezeichnen die verwendeten Proteinsequenzen der NCBI-Datenbank bzw. die Lokus-ID. Die jeweiligen E-Werte der BLAST-Bestimmung sind angegeben und beziehen sich auf die *gonnet*-Matrix unter Verwendung der humanen Proteinsequenzen. Die Verwendung der Sequenzen von *S. cerevisiae* führte zu vergleichbaren E-Werten.

*al.*, 2007). Die weiteren beiden Untereinheiten ScTrs120 und ScTrs130 konnten auch als HsTRAPPc9 und HsTRAPPc10 in Säugerzellen identifiziert werden. Zu allen drei Untereinheiten konnten in dieser Arbeit durch BLAST-Analyse keine zweifelsfreien homologen Sequenzen in *T. brucei* gefunden werden. Da diese drei Untereinheiten sowie HsTRAPPc6 innerhalb der eukaryotischen Domäne nur schwach konserviert sind, ist eine Identifizierung allein durch eine BLAST-Analyse schwierig. Allerdings konnten die fraglichen Untereinheiten Trs120, Trs130 und Trs65 im Genom von *T. cruzi* phylogenetisch ermittelt werden (Cox *et al.*, 2007). Da die BLAST-Analyse mit dem Genom von *T. cruzi* zu Ergebnissen mit ähnlichen E-Werten wie die BLAST-Analyse mit dem Genom von *T. brucei* führt, kann die Existenz dieser drei Untereinheiten in *T. brucei* angenommen werden.

Der TRAPP I-Komplex von *H. sapiens* ist nur ca. 670 kDa groß und somit kleiner als der TRAPP I-Komplex in *S. cerevisiae* (1.094 kDa). Dieser Unterschied ist vermutlich auf die generell kleineren Untereinheiten (Sacher *et al.*, 2000) sowie auf das Fehlen der Untereinheit Trs85 zurückzuführen. In Säugerzellen liegen die Untereinheiten auch einzeln vor, während die Untereinheiten in der Hefe fast ausschließlich komplexiert vorliegen (Sacher *et al.*, 2000). Insofern ist es möglich, dass der TRAPP I-Komplex auch in *T. brucei* sich bezüglich der Komplexierung und somit der genauen Funktion und Regulation von dem TRAPP I-Komplex der Hefe unterscheidet.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten BLAST-Analysen kann die Existenz eines TRAPP-Komplexes in *T. brucei* angenommen werden. Um welchen der beiden Komplexe es sich handelt oder ob beide Komplexe vorliegen kann jedoch nicht beantwortet werden.

Bei einer ganzen Anzahl von identifizierten Proteinsequenzen in *T. brucei* stimmt die Domänenabfolge laut SMART-Analyse nicht mit der der homologen Proteinsequenzen von *H. sapiens* oder *S. cerevisiae* überein. Da die SMART-Analyse durch HMM-Algorithmen die lokalen Homologien von Aminosäuresequenzen und deren Anordnung in Domänen unter Berücksichtigung von konservierten Aminosäuren auswertet, können Abweichungen zwischen orthologen Proteinen generell auf drei Ursachen zurückgeführt werden. Neben der natürlichen Divergenz zwischen orthologen Proteinen aus phylogenetisch weit entfernten Spezies ist es auch möglich, dass die diagnostizierte Domäne überhaupt keine spezifische Funktion in dem Protein besitzt und sich die orthologen Proteine trotz unterschiedlicher Domänen funktional kaum unterscheiden. Drittens kann die SMART-Analyse nicht jede Variante von vorliegenden Domänen und Strukturen aus Mangel an Vergleichsdaten erkennen. Die Zuverlässigkeit der SMART-Analyse von Transmembrandomänen beispielsweise liegt zwischen 64 und 85% (Möller *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2002). Deshalb sind Abweichungen zwischen der Anordnung von vorhergesagten Domänen und den tatsächlich existenten Domänen möglich. Die Ergebnisse der SMART-Analysen können im Rahmen dieser Arbeit

fast ausschließlich im Hinblick auf die phylogenetische Distanz zwischen den verglichenen Organismen diskutiert werden.

In diesem Kontext wäre zunächst das Fehlen der Saposin B-Domäne in der sauren Sphingomyelinase von *T. brucei* zu erwähnen. Bei der beschriebenen sauren Sphingomyelinase aus *H. sapiens* erhöht diese Domäne die Enzymaktivität durch die Bindung des Substratlipides und ist nicht essentiell für die Reaktion als solche (Munford *et al.*, 1995). In Humanzellen spielt die Saposin B-Domäne generell bei der Lipidbindung und Porenbildung durch unterschiedliche Proteine wie beispielsweise der Acyloxyacyl-Hydrolase eine Rolle. Demnach ist anzunehmen, dass die Domäne eine rein katalytische Funktion besitzt und den Transport der sauren Sphingomyelinase nicht beeinflusst. Sowohl die vermutete Acyloxyacyl-Hydrolase (Tb10.70.2420) als auch die vermutete saure Sphingomyelinase von *T. brucei* besitzen laut SMART-Analyse keine Saposin B-Domäne. Die bislang einzige Saposin B-Domäne in *T. brucei* wurde in der GPI-Inositol-Deacylase nachgewiesen (Bruhn 2005; Güther *et al.*, 2006). Die Regulation durch die Saposin B-Domäne in *T. brucei* findet also vermutlich nur in einem spezifischen Einzelfall statt, während die Aktivität bspw. der sauren Sphingomyelinase anders reguliert wird.

Allerdings weist das humane Protein mit der höchsten Homologie zur sauren Sphingomyelinase von *T. brucei* ebenfalls keine Saposin B-Domäne auf und ist als Sphingomyelinase-ähnliches Protein 3.b annotiert. Dieses Protein ist bislang nicht näher charakterisiert worden, wird allerdings exprimiert und von Mannose-6-Phosphatrezeptoren gebunden (Sleat *et al.*, 2006). Das Vorhandensein der SCOP-Metallophosphatasedomänen in allen drei Proteinsequenzen weist auf grundsätzlich ähnliche Funktionen hin, wobei die Unterschiede der Domänen auf unterschiedliche Substratspezifität und Regulation hinweisen. Trotz der Unterschiede in der Domänenstruktur ist Tb927.4.1110 die Proteinsequenz in *T. brucei* mit der höchsten Sequenz- und Strukturhomologie zur sauren Sphingomyelinase in *H. sapiens*.

Der Guaninnukleotidaustauschfaktor *HsGEF2* weist die beiden durch SMART-Analyse deutlich nachweisbare Pfam-Domänen Sec7 und DUF1981 auf. Die Unterschiede zwischen *TbGEF2* und *HsGEF2*/BIG2 sind nur schwer einzuschätzbar, da die in *TbGEF2* fehlende Pfam-Domäne DUF1981 bisher nicht charakterisiert worden ist. Während die Sec7-Domäne essentiell für den Austausch des Guaninnukleotids ist, ist über DUF1981 lediglich bekannt, dass sie im Zusammenhang mit der Sec7-Domäne auftritt. Deshalb wird vermutet, dass DUF1981 an der GTP-Hydrolyse durch den ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) beteiligt ist. Da die BLAST-Analyse der Sequenz der Domäne mit der Datenbank von *T. brucei* ebenfalls zu keinen eindeutigen Ergebnissen führt (bester E-Wert 0,00034), liegt die Vermutung nahe, dass diese Domäne in *T. brucei* nicht konserviert ist. Die Sec7-Domäne als solche konnte nur in zwei Proteinsequenzen von *T. brucei* gefunden werden. Im Vergleich hierzu kommt die Domäne in insgesamt 23 humanen Proteinen vor. Während in Säugerzellen 15



unterschiedliche GEFs mit Sec7-Domänen die Spezifität von 6 ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) regulieren (Casanova 2007), besitzt *T. brucei* lediglich 2 vermutliche GEFs mit Sec7-Domänen für insgesamt 2 ARFs (Price *et al.*, 2005). Dem steht ein höherer Anteil der gesamten ARF-Familie an der Gesamtanzahl aller kleinen GTPasen in *T. brucei* gegenüber (Field und O'Reilly 2008). Genauere Untersuchungen werden zeigen, ob die Aktivierung und Membranbindung von *Tb*ARFs auf der Interaktion mit anderen Proteinen als in Säugerzellen beruht oder ob die Aufgaben der *Tb*ARFs verglichen mit Säugerzellen reduziert sind, so dass keine ähnlich differenzierte Aktivierung notwendig ist.

Ähnlich wie beim *ScBet3* im TRAPP-Komplex ist *ScVPS11* in zwei Tethering-Komplexen präsent, dem CORVET und dem HOPS-Komplex, welche das Tethering an frühen und späten Endosomen ausführen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der SMART-Analysen für *ScVPS11*, *HsVPS11* und *TbVPS11* spiegeln nicht unbedingt unterschiedliche Funktionen und Interaktionen wider.

Die N-terminalen Domänen unterscheiden sich primär in der Anzahl und Vorhandensein der 4-strängigen Beta-Faltblätter ( $\beta$ -Transducin-Wiederholungen, WD40), so dass die Strukturen nicht völlig voneinander abweichen.  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen treten in einer Vielzahl von Proteinen auf und haben vielfältige Funktionen beispielsweise bei der Signal Transduktion, der Transkriptionskontrolle und der Apoptose. Von den in dieser Arbeit analysierten Proteinsequenzen weisen *HsaCOP* und *HsVPS11*  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen auf.

Sowohl *HsaCOP* als auch *TbaCOP* besitzen  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen. Allerdings besitzt das humane Protein laut SMART-Analyse eine  $\beta$ -Transducin-Domäne mehr als das trypanosomale. Diese zusätzliche, siebte  $\beta$ -Transducin-Wiederholung in *HsaCOP* ist allerdings nur schwach ausgeprägt mit einem E-Wert von 13,8.

Die geringere Anzahl von  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen in *TbVPS11* zeigt einige Besonderheiten der trypanosomalen CORVET/HOPS-Komplexe auf. *HsVPS11* und *ScVPS11* hingegen unterscheiden sich lediglich in der Anzahl von zum Teil nur schwach ausgeprägten  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen. Obwohl die E-Werte der Domänen in *HsVPS11* signifikant sind ( $10^{-13}$ – $10^{-20}$ ), sind die namensgebenden WD-Aminosäuren nur bei der ersten Wiederholung konserviert. *TbVPS11* weist an ähnlicher Position eine kürzere Domäne mit siebenblättrigen viersträngigen  $\beta$ -Faltblättern auf, deren Funktion unbekannt ist.

Bemerkenswert ist, dass *VPS41*, welches vermutlich zusammen mit *VPS11* im HOPS-Komplex interagiert, in *T. brucei* (Tb927.6.2770) zwei  $\beta$ -Transducin-Wiederholungen aufweist, deren E-Werte allerdings nicht sehr signifikant sind ( $>3 \times 10^{-1}$ ). Das humane Ortholog hingegen besitzt nur eine  $\beta$ -Transducin-Wiederholung und zudem laut SMART-Analyse noch eine Clathrin *heavy chain* - Domäne, die wiederum so im trypanosomalen Protein nicht vorhersagbar ist. Abgesehen von den Beschränkungen der SMART-Analyse

zeigt sich eine starke Varianz zwischen den humanen und den trypanosomalen Proteinen. Das Vorhandensein der Clathrin *heavy chain* - Domäne von VPS41 ist mit dessen Funktion beim Transport der alkalischen Phosphatase vom Golgi-Apparat zum Lysosom mit AP-3 in Verbindung gebracht worden (Lemmon und Traub 2000). Bis auf das Vorhandensein von TbAP-3 gibt es in *T. brucei* allerdings keinen Hinweis auf die Existenz eines ähnlichen Transportweges.

Die Unterschiede zwischen HsVPS11/VPS41 und TbVPS11/VPS41 schlagen sich im Aufbau der beiden Multiproteinkomplexe CORVET/HOPS nieder. Beide Proteinkomplexe bestehen aus dem gleichen Kernkomplex sowie zwei zusätzlichen Untereinheiten (Tabelle 13). Der Kernkomplex ist ein Tetramer, an dessen Bildung die Untereinheiten TbVPS11, TbVPS16 und TbVPS33 beteiligt sind. Diese drei Untereinheiten sind in der Gendatenbank von *T. brucei* annotiert. Die BLAST-Analyse mit der verbliebenen vierten Untereinheit des Kernkomplexes

**Tabelle 13: Übersicht über die Untereinheiten der CORVET- und HOPS-Komplexe**

	Untereinheiten beider TRAPP- Komplexe	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. brucei</i>
CORVET	VPS3 ( <i>HsVam6</i> )	-*	CAA37865	Tb11.02.2360 / Tb10.70.6570 $2,3 \times 10_{-5}$ / $4,5 \times 10_{-16}$ *
	VPS8	a: NP_001009921 b: NP_056118		Tb11.01.2810 $2,8 \times 10_{-21}$ - $4,3 \times 10_{-22}$
Kern- Komplex	VPS11	NP_068375		Tb927.8.7200 $4,4 \times 10_{-40}$
	VPS16	NP_536338		Tb10.6k15.0550 0.00088*
	VPS18	NP_065908		Tb11.47.0033 $4,2 \times 10_{-27}$ - $4,6 \times 10_{-24}$
	VPS33	a: NP_075067 b: NP_061138		Tb927.3.2280 $2,9 \times 10_{-71}$ - $6,1 \times 10_{-48}$
HOPS	VPS39	NP_056104		Tb927.1.4760 $2,2 \times 10_{-24}$
	VPS41	a: NP_055211 b: NP_542198		Tb927.6.2770 $2,0 \times 10_{-31}$

\* keine eindeutige Zuordnung unter einem E-Wert von  $10^{-5}$  möglich

\*\* stark unterschiedliche Ergebnisse nach *Blossum62*-Matrix ( $2,3 \times 10_{-5}$ ) und *gonnet*-Matrix ( $4,5 \times 10_{-16}$ ) mit vollkommen unterschiedlichen Ergebnissen bei Verwendung der angegebenen Sequenz aus *S. cerevisiae*

Die Identifizierungsnummern bezeichnen die verwendeten Proteinsequenzen der NCBI-Datenbank bzw. die Lokus-ID. Die jeweiligen E-Werte der BLAST-Bestimmung sind angegeben.

VPS18 führt zu deutlich homologen Sequenzen und somit zur Bestätigung, dass zumindest einer dieser Komplexe in *T. brucei* vorliegt.

Die beiden Untereinheiten, die für den HOPS-Komplex charakteristisch sind, sind VPS41 und VPS39. Beide Proteine sind als Orthologe in der Datenbank annotiert worden.

Von den beiden für den CORVET-Komplex spezifischen Untereinheiten kann für VPS8 eine Proteinsequenz mit hoher Homologie gefunden werden. Nur *TbVPS3* ist nicht durch BLAST-Analyse bestimmbar. Allerdings ist VPS3 unter Eukaryoten nicht stark konserviert, da auch das humane Ortholog zu *ScVPS3* aufgrund der hohen Homologie zu *HsVPS39* bislang nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Deshalb wird vermutet, dass eine der beiden *HsVPS39*-Isoformen (TRAP-1 und TLP) das orthologe Protein zu *ScVPS3* ist (Peplowska *et al.*, 2008). Der CORVET-Komplex als solcher konnte bislang nicht in Säugerzellen nachgewiesen werden (Peplowska *et al.*, 2008). Insgesamt kann die Existenz des HOPS-Komplexes in *T. brucei* durchaus angenommen werden, während die Existenz des CORVET-Komplexes zwar möglich ist, diese allerdings noch deutlicher bestätigt werden müssen.

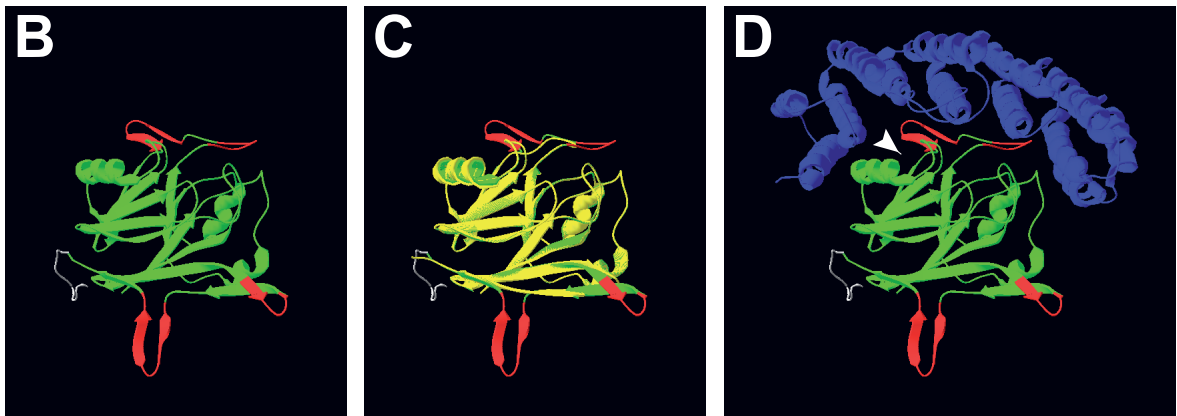
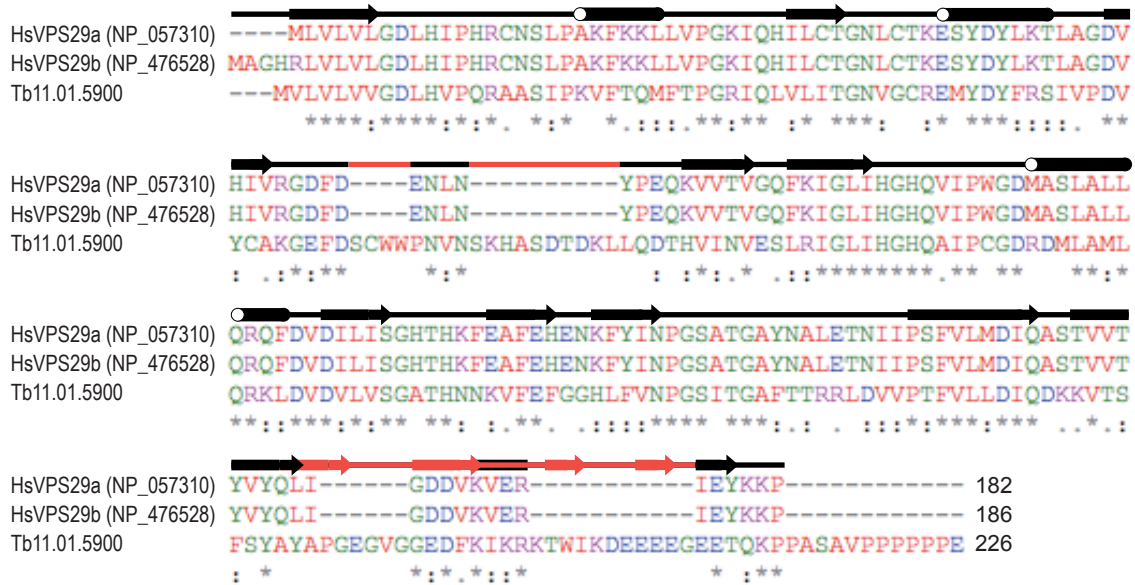
Der Vergleich der Domänen von *HsVPS29a*, *HsVPS29b* und *TbVPS29* zeigt, dass *TbVPS29* trotz gemeinsamer VPS29-Domäne keine erkennbare Metallophosphatasedomäne innerhalb der VPS29-Domäne aufweist. Diese typische Faltung ist für das humane Protein, die Komplexierung von divalenten Kationen für das murine Protein nachgewiesen worden (Collins *et al.*, 2005a). Trotz der Mutation des bei Metallophosphatasen notwendigen Histidins (H63/H67) im katalytischen Zentrum zu Phenylalanin bei *HsVPS29* konnte eine Metallophosphataseaktivität nachgewiesen werden (Damen *et al.*, 2006).

Die Position dieses Phenylalanins scheint sowohl in der humanen als auch in der trypanosomalen Sequenz konserviert zu sein, jedoch tritt bei *TbVPS29* entsprechend dem Alignment eine Insertion von vier Aminosäuren, darunter zwei Tryptophane, direkt nach dieser Aminosäure auf. Diese Insertion verhindert möglicherweise trotz hoher Homologie die Erkennung der Metallophosphatasefaltung in *TbVPS29*. *TbVPS29* besitzt laut SMART-Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit die für VPS29 typische Domäne (PDB-ID 2r17), so dass die Identifikation als VPS29 erfolgen kann.

Bezüglich des C-Terminus unterscheiden sich die *HsVPS29* und *TbVPS29* signifikant (Abb. 61). *TbVPS29* ist nicht nur 28 AS länger, innerhalb dieser Aminosäuren gibt es auch zwei auffällige Motive (DEEEEXEE AS 203-210 und der C-Terminus PPPPPPE). *HsVPS29* kann C-terminal mit GFP fusioniert werden ohne dass es zu größeren Problemen kommt (R. Rojas, persönliche Mitteilung). Alle Versuche hingegen, *TbVPS29* mit YFP zu markieren, sind trotz Verbindungspeptid und Überexpression durch den *T7*-Promotor gescheitert, was Schwierigkeiten bei der dreidimensionalen Struktur vermuten lässt.

Der Vergleich der Modelle zeigt, dass *TbVPS29* gerade im Bereich der Bindungsstelle von SNX1/2 einen zusätzlichen Loop bildet. Inwiefern dies auf eine andere Regulation

**A**



**Abb. 61: Vergleich zwischen *HsVPS29* und *TbVPS29*:** A) Alignment der beiden humanen Isoformen von VPS29 mit dem vermuteten orthologen Protein aus *T. brucei*. Die rot eingezeichneten Sekundärstrukturen bezeichnen die Strukturen des Modells von *TbVPS29*. B) Modell der Struktur von *TbVPS29*. Die grünen Bereiche entsprechen strukturell dem humanen Ortholog, die roten Bereiche sind die nach swissmodel.expasy.org berechneten Strukturen. Der graue Bereich am C-Terminus konnte nicht berechnet werden und wurde nur zum Vergleich willkürlich angesetzt. C) Überlagerung der beiden Modelle von *HsVPS29* (gelb) und *TbVPS29* (grün/rot). D) Position des theoretischen *TbVPS29*-Modell in der Dimerstruktur von *HsVPS35/HsVPS29* (nicht gezeigt). Die Bindungsstelle von SNX1/2 ist mit dem Pfeil markiert.

und andere Interaktionspartner hinweist, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sagen.

Die hohe Identität von 85-96% der vier möglichen STT3-Untereinheiten von *T. brucei* sowie ihre aufeinander folgende Anordnung auf Chromosom 5 (Abb. 62) lässt vermuten, dass die Gene durch Duplikation entstanden sind. Die offenen Leseraster sind mit Ausnahme von Tb927.5.880 vollständig. Letzteres ist vermutlich nicht enzymatisch aktiv, da das postulierte

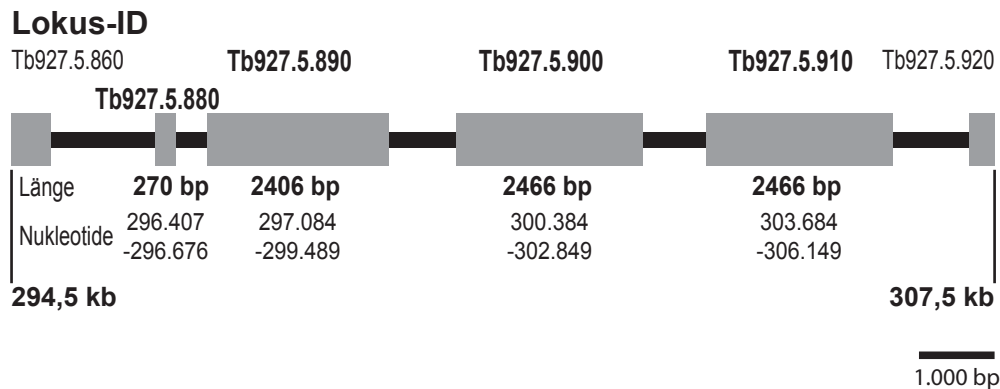


Abb. 62: Genlokus der STT3-Gene auf Chromosom 5 von *T. brucei*

katalytische Zentrum WWDYG (Igura *et al.*, 2008) fehlt und sowohl der N-Terminus wie auch der C-Terminus von den anderen Sequenzen abweicht. Die Aminosäuresequenz AS23 bis 82 stimmt jedoch zu 100% mit den anderen drei Genen überein. Die 8 verbleibenden C-terminalen Aminosäuren werden durch eine Sequenz codiert, welche ebenfalls in den intergenischen Regionen zwischen Tb927.5.890/Tb927.5.900 und Tb927.5.900/Tb927.5.910 zu finden ist. Die N-terminale codierende Sequenz für die ersten 22 Aminosäuren ist nicht ohne weiteres identifizierbar.

Im Vergleich zu der STT3-Untereinheit von *L. major* ist auffällig, dass *L. major* ebenfalls über vier Allele der STT3-Untereinheit verfügt, die allerdings alle ähnlich groß sind, jedoch ebenfalls in Tandem angeordnet sind. Das Alignment der trypanosomalen Sequenzen weist auf eine größere Homologie zu den Isoformen A, B und D aus *L. major* hin, welche die Funktion des OST-Komplexes in Hefe übernehmen konnten (Hese *et al.*, 2008). Das Fehlen der weiteren Untereinheiten außer STT3 im Genom von Kinetoplastiden lässt vermuten, dass *TbSTT3* wie *LmSTT3* ebenfalls ohne weitere Untereinheiten als Homodimer die Funktion des OST-Komplexes übernimmt (Kelleher 2005), wobei die breitere Substratspezifität vermutlich auf Fehlen der regulatorischen Bindungsstelle zurückzuführen ist. Die Dimerisierung ist zwar ebenfalls postuliert worden (Nasab *et al.*, 2008), allerdings auch bei *ScSTT3* nach Lösung mit Digitonin beobachtet worden (Chavan und Lennarz 2006). Dies entspricht den Beobachtungen, die bei Gelfiltration keine Dimere nachweisen konnten, welche in nativer Gelelektrophorese zu sehen waren (Igura *et al.*, 2008). Deshalb ist die Dimerisierung der STT3-Untereinheiten möglicherweise nicht nur auf die einzelne STT3-Untereinheit in Kinetoplastiden beschränkt.

Die Identifikation von Tb927.5.880 als *TbSTT3* beruht auf der hohen Homologie zu der humanen Sequenz und der Identifikation der STT3-Domäne durch die SMART-Analyse. Allerdings differieren die Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl der Transmembrandomänen. Die trypanosomale STT3 weist laut SMART-Analyse lediglich 10 Transmembrandomänen auf, während das humane Protein theoretisch 11 Transmembrandomänen aufweist. Dies ist identisch mit der postulierten Transmembrandomänenanzahl der STT3 in *M. musculus*

(Caron *et al.*, 2006). Der Vergleich der Domänen basierend auf einem Alignment legt nahe, dass die Transmembrandomäne nah dem C-Terminus in *TbSTT3* nicht nachweisbar ist. Da aber gerade der C-Terminus in den STT3-Isoformen A und B in *M. musculus* nur wenig konserviert ist und zu unterschiedlichen Lokalisationen führt (Caron *et al.*, 2006), stellt dies die Identifikation von *TbSTT3* nicht grundsätzlich in Frage. Zudem lassen die fehlenden anderen Untereinheiten in *T. brucei* den Schluss zu, dass sich die Regulation von *TbSTT3* und damit auch der Aufbau des Proteins stark von der des humanen STT3-Komplexes unterscheidet.

Wesentlich problematischer ist das Fehlen einer C-terminalen Transmembrandomäne in *TbERGIC53*. Die Funktion von ERGIC-53 beim präferentiellen Transport von Cathepsin hängt eng mit der Sortierung des zytosolischen Teils des Transmembranproteins *HsERGIC-53* zusammen (Nyfeler *et al.*, 2006).

Die Analyse mit TMHMM 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998) zeigte eine Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 30 und 52. Im Gegensatz zu den bekannten Isoformen von ERGIC-53 wäre sie N-terminal zu der Lektin-Domäne angeordnet. Laut dieser Analyse weist die Sequenz von *TbERGIC-53* allerdings kein Signalpeptid auf.

Die in der Datenbank annotierte Nukleotidsequenz weist allerdings ein zweites, alternatives Startcodon (Met13) auf. Bei Analyse dieser kürzeren Proteinsequenz wird ein Signalpeptid erkannt, welche allerdings die Transmembrandomäne beinhaltet. Die Transmembrandomäne wird bei Synthese in das raue ER und Abspaltung des Signalpeptides also unmöglich.

Eine tatsächlich ausgeprägte Transmembrandomäne nahe dem N-Terminus des Proteins dagegen würde durch die zytosolische Lokalisation der Lektindomäne und das Fehlen des Signalpeptides eine sehr starke Abweichung zwischen *HsERGIC-53* und *TbERGIC-53* bedeuten. Aus diesem Grund kann die angezeigte N-terminalen Transmembrandomäne vernachlässigt werden. Die gelungene Expression des GFP-ERGIC-53-Fusionsproteins mit der erwarteten Lokalisation unter Austausch der Signalsequenz bestätigt diese Annahme.

Da die Proteinsequenzen *HsERGIC-53* und *TbERGIC-53* gerade im C-terminalen Bereich stark voneinander abweichen, kann über die Membranverankerung von *TbERGIC-53* nichts gesagt werden. Es ist gut möglich, dass eine C-terminale Transmembrandomäne vorliegt, aber durch den SMART-Algorithmus nicht erkannt wird. *TbERGIC-53* kann aber auch ein lösliches Protein sein, welches durch ein Adaptorprotein an die Membran gebunden wird.

## **5.2. Auswahl des GPI-verankerten Fusionsproteins**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die nähere Untersuchung des intrazellulären Transportes von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei* unter Zuhilfenahme von fluoreszierenden Reporterproteinen zu ermöglichen. *T. brucei* eignet sich besonders für diese Untersuchungen,



da in diesem Organismus ein großer Teil der Gesamtproteine GPI-verankert sind (15-20 %) verglichen mit anderen eukaryotischen Zellen (2-3%).

Jedoch muss einer solchen Untersuchung zunächst die Wahl eines geeigneten Reporterproteins zugrunde liegen. Der größte Teil der bekannten Arbeiten behandelt die Sortierung von Transmembranproteinen, welche deren Lokalisation durch die zytosolische Domäne beeinflusst werden kann. Im Fall von GPI-verankerten Proteinen finden spezifische Sortierungsmechanismen notwendigerweise nur über das lumenale Protein oder in *rafts* über die GPI-Komponente statt. Eine Sortierung allein aufgrund der Membranverankerung kann nur generell zu der Trennung transmembranverankerter Proteine von GPI-verankerten Proteinen führen und somit nicht durch die Identität des GPI-verankerten Proteins als solches beeinflusst sein. Eine spezifische Sortierung und Trennung von GPI-verankerten Proteinen aufgrund ihrer Proteinstruktur ist allerdings möglich. Deshalb ist die Wahl eines geeigneten GPI-verankerten Reporterproteins entscheidend.

Als prominentestes GPI-verankertes Protein in *T. brucei* bot sich zunächst VSG als mögliches Reporterprotein an. Nachdem Versuche, eine GFP-Domäne seitlich an das VSG in die N-terminale Domäne anzufügen, zu keinen Ergebnissen geführt hatten, war die Substitution der gesamten N-terminalen Domäne der nächstliegende Schritt. Die Grenze zwischen der C- und der N-terminalen Domäne von VSG221 liegt ungefähr im Bereich der Aminosäuren Thr354 bis Leu358. VSG117 wurde nur wenige Aminosäuren von der Grenze zwischen den Domänen entfernt trunkiert. Das Modell Abbildung 5 verdeutlicht den Aufbau des Fusionsproteins aus den beiden C-terminalen Domänen und GFP im Vergleich zum modellierten nativen VSG. Während die N-terminale Domäne des VSG etwa 95 Å lang ist, ist GFP lediglich 49 Å hoch. In der Breite unterscheiden sich beide Proteine nur wenig mit 52 Å bzw 49 Å. Allerdings ist die N-terminale Domäne an der dünnsten Stelle wesentlich schmaler als GFP mit einem Durchmesser von etwa 20 Å. GFP kann demnach ähnlich viel Raum einnehmen wie die N-terminale Domäne von VSG und sollte deshalb bei einer vertikalen Ausrichtung in den dichten Mantel an VSG-Proteinen integrierbar sein. Die mit den jeweiligen Expressionsvektoren transfizierten Zellen zeigten eine GFP-Fluoreszenz. Das Vorhandensein dieser Fluoreszenz beweist, dass die GFP-Domäne des Proteins korrekt gefaltet ist. Über die korrekte Faltung der C-terminalen Domäne kann jedoch nichts gesagt werden.

Diese Lokalisation des Proteins im ER kann auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Einer dieser Faktoren kann eine Fehlfaltung der C-terminalen VSG-Domänen des Fusionsproteins sein, welche eine ER-Retention durch die Exposition von hydrophoben Aminosäuren bewirken kann.

Ein weiterer Faktor kann die GPI-Verankerung des Proteins sein. Eine Mutante von VSG117, welche durch Punktmutationen nicht mehr GPI-verankert war, lokalisierte vor allem im ER (Böhme und Cross 2002). Ebenso wurde eine Variante von VSG117, deren C-Terminus um



die gesamte Signalsequenz der GPI-Verankerung verkürzt war, weniger effizient aus dem ER transportiert (Triggs und Bangs 2003). Im letzteren Fall konnte nachgewiesen werden, dass das unverankerte Protein im Lysosom abgebaut wurde. Allerdings konnte die GPI-Verankerung des Fusionsproteins aus verkürztem VSG117 und GFP durch die Extraktion mit Triton gezeigt und dieser Faktor deshalb ausgeschlossen werden.

Als dritte Ursache für die ER-Retention kommt eine fehlerhafte oder nicht stattfindende Dimerisierung der Monomere vor dem Transport in den Golgi-Apparat in Frage. Die Dimerisierung von VSG beruht vermutlich auf der N-terminalen Domäne, da durch Proteasen gewonnene N-terminale Domänen von VSGs in Lösung dimerisieren (Johnson und Cross 1979). Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden Monomere des VSGs ILTat 1.22 durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind (Cross 1977). Durch das Fehlen der N-terminalen Domäne kann vermutlich keine Dimerisierung stattfinden, wodurch der Transport des Fusionsproteins zum Golgi-Apparat erschwert wird und die meisten Proteine im ER zurückgehalten werden. Die erschwerte Dimerisierung konnte zwar nicht nachgewiesen werden, ist aber eine mögliche Ursache für die ER-Lokalisation von VSG117:GFP.

Nach Transfektion mit dem Expressionsvektor pKD4.tVSG117:GFP exprimierte einer der Klone zwar das fluoreszierende Fusionsprotein, allerdings zeigte sich, dass diese Zelllinie zugleich ein weiteres fluoreszierendes Protein exprimierte. Diese Fluoreszenz eröffnete ein weites Spektrum an Möglichkeiten. Das fluoreszierende Protein konnte als VSG identifiziert werden und wurde als VSG'Y' benannt. Die rekombinanten Zellen, welche VSG'Y' exprimieren, weisen im Kulturmedium HMI9 die beobachtete Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge um 375 nm auf. In Waschpuffern wie TDB hingegen konnte keine Fluoreszenz bei denselben Zellen mehr beobachtet werden. Die Untersuchungen mit verschiedenen Chemikalien und Komponenten ergab, dass Phenolrot als Fluorophor des Proteins notwendig für die Fluoreszenz ist. Die Modellierung des Proteins ergab eine potentielle Bindetasche in der N-terminalen Domäne des Proteins, die Phenolrot aufnehmen könnte und die von aromatischen Aminosäuren gesäumt wird.

VSG'Y' ist ein Lebendzellmarker, da es ausschließlich auf lebenden Zellen fluoresziert. Der genaue Mechanismus der Fluoreszenz ist bislang unbekannt. Die Löschung einer Fluoreszenz nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd kann mit der kovalenten Vernetzung der Amidbindungen zusammenhängen, welche auch andere Verteilungen der delokalisierten Elektronen ermöglichen können. Eine Fluoreszenzlöschung durch Fixierung mit Paraformaldehyd ist mittlerweile bei mehreren fluoreszierenden Proteinen wie zum Beispiel DsRed bekannt.

Die Fluoreszenzeigenschaft beruht vermutlich auf einer Lipidperoxidation, welche durch eine Försterresonanz hervorgerufen wird. Das VSG fungiert hierbei vermutlich als Lichtsammelfalle (M. Engstler, persönliche Kommunikation).

Trotz des ungeklärten Entstehens der Fluoreszenz ermöglicht VSG'Y' die Markierung der Zelloberfläche in lebenden Trypanosomen bei gleichzeitig exprimierten GFP-Fusionsproteinen, ohne dass die zusätzliche Expression eines artifiziellen Proteins die Ausbildung des VSG-Mantels grundsätzlich stören würde.

EP1 ist unter Berücksichtigung der Vereinbarkeit mit dem VSG-Mantel und einer Funktion, welche die Transportprozesse in der Zelle möglichst wenig beeinflusst, das Reporterprotein der Wahl. Aufgrund der postulierten Struktur (Roditi *et al.*, 1989) ist EP1 vermutlich mit der Integrität des VSG-Mantels vereinbar. Die Position von GFP im Fusionsprotein nahe dem N-Terminus führt theoretisch zu einer Lokalisation des GFPs oberhalb des VSG-Mantels und sollte deshalb auch keine Probleme nach sich ziehen.

Allerdings kann EP1:GFP nur intrazellulär und in der Flagellartasche nachgewiesen werden. Auf der pellikularen Zelloberfläche konnte kein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Dieser Ausschluss des Fusionsproteins von der pellikularen Zelloberfläche vereinfacht den Einsatz des Proteins bei der Untersuchung von intrazellulären Transportwegen. Gleichzeitig ist dieser Ausschluss von EP1:GFP auch der Hinweis auf eine Sortierung zweier GPI-verankerter Proteine, da VSG nach wie vor die pellikulare Zelloberfläche erreicht.

Bei Verwendung eines leicht modifizierten EP1 konnte nur wenig EP1 durch EM-Aufnahmen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Schwartz *et al.*, 2005). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass EP1 in das umgebende Medium abgegeben wird, und deshalb postuliert, dass die Bindung von EP1 an die Membran aufgrund des einzelnen GPI-Ankers instabil ist. Das EP1 mitsamt GPI-Anker die Membran verlässt, ist auch durch die lumenale Lokalisation von EP1:GFP belegt. Allerdings weist das zitierte EP1 in methanolfixierten BSF eine vorwiegende Lokalisation in der Flagellartasche auf, während die in dieser Arbeit beobachtete intrazelluläre endosomale Lokalisation nicht beobachtet wurde. Trotz ähnlicher Expressionsniveaus aufgrund derselben Promotoren in den Expressionsvektoren zeigen sich hier deutliche Unterschiede in den Ergebnissen, welche durch den direkten Vergleich der entsprechenden Zelllinien bestätigt werden müssten. In dieser Arbeit konnte die Lokalisation auf der pellikularen Zellmembran nicht bestätigt werden, da auch bei längerer Exposition kein Fluoreszenzsignal auf der pellikularen Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Erst die signifikante Erhöhung der Expression von GPI-verankerten Proteinen führte zu einer solchen Oberflächenlokalisation von EP1:GFP in BSF.

Diese Oberflächenlokalisation von EP1:GFP oder VSG117:GFP konnte erst nach Transfektion der Zellen mit dem Vektor pTsarib(hyg).VSG117:GFP festgestellt werden bei gleichzeitiger Expression von EP1:GFP aus der *expression site* und VSG'Y' durch den Prozyklin-Promotor. Obwohl die Zellen die für VSG117:GFP typische GFP-Fluoreszenz im ER aufwiesen, hatte die zusätzliche Expression den Effekt, dass GFP auf die pellikulare Zelloberfläche jenseits der Flagellartasche gelangen konnte. Gerade aufgrund der starken Retention

von VSG117:GFP im ER ist dieses Phänomen nur schwer erklärbar. Die Gemeinsamkeit aller drei Moleküle ist die GPI-Verankerung, welche insofern vermutlich einen deutlichen Effekt auf den Retentionsmechanismus an der Flagellartasche hat. Spätere Experimente werden der Frage nachgehen müssen, ob eine Sättigung mit GPI-Ankern zum Ausfall des Retentionsmechanismus zwischen Golgi und ER führt. Dadurch könnte eine größere Anzahl an GPI-verankerten Proteinen an der Flagellartasche auf die pellikulare Zellmembran drängen und so der Kontrollmechanismus zwischen Flagellartasche und pellikularer Zelloberfläche beeinflussen.

Die unterschiedlichen Sortierungen von VSG und EP1:GFP kann nur auf den Unterschieden der Proteinkomponente beruhen, da die GPI-Anker einheitlich je nach Lebensstadium modifiziert werden (Zitzmann *et al.*, 2000). Lediglich die Anzahl der GPI-Anker (GPI-Valenz) aufgrund der Dimerisierung der VSGs ist unterschiedlich und eine weiteres mögliches Sortierungsmerkmal.

Es ist postuliert worden, dass die Anzahl an GPI-Ankern die Lokalisation von GPI-verankerten Proteinen maßgeblich beeinflusst. In diesem Kontext wurde der Ausschluss von EP1 von der pellikularen Zelloberfläche auf die Abgabe der intakten, GPI-verankerten Proteine ins Kulturmedium zurückgeführt (Schwartz *et al.*, 2005). Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass diese freien GPI-verankerten EP1 über die pellikulare Zelloberfläche der Trypanosomen ins Medium gelangten. Bei der in diesen Arbeiten ermittelten Dissoziationsraten von EP1 würden pro Stunde 22% der vorhandenen EP1-Moleküle ins Kulturmedium abgegeben werden, ohne über Immunofluoreszenz auf der pellikularen Zelloberfläche nachweisbar zu sein. Eine direkte Diffusion der im Lumen der Flagellartasche vorliegenden EP1-Moleküle erscheint da wahrscheinlicher. Zudem wird vermutet, dass die Beugung der Zellmembran im Zuge der Exozytose der exozytischen Carrier die Abgabe GPI-verankerter Proteine ins Lumen der Flagellartasche erleichtert und so das Vorhandensein von sowohl VSG als auch TfR und EP1 im Lumen der Tasche erklären kann (Overath und Engstler 2004; Engstler, persönliche Mitteilung).

Auch der Transferrinrezeptor ESAG6/7 wird nicht zur pellikularen Zelloberfläche transportiert (Mussmann *et al.*, 2004). Dieser Rezeptor weist zwar vermutlich eine hohe Strukturanalogie zum VSG auf, ist allerdings nur durch einen GPI-Anker an der Zellmembran befestigt (Hobbs und Boothroyd 1990; Carrington und Boothroyd 1996). Der Transferrinrezeptor lokalisiert sowohl in der Membran als auch im Lumen der Flagellartasche. Bei extremer Überexpression des Rezeptors gelangt der Rezeptor allerdings auch auf die pellikulare Zelloberfläche (Mussmann *et al.*, 2003). Aus diesem Grund liegt die Annahme nah, dass der Sortierungsmechanismus, welcher TfR und EP1:GFP von der pellikularen Zelloberfläche fernhält, saturierbar ist. Die nachweisbare erhöhte Lokalisation von EP1:GFP nach *knock down* der STT3 auf der pellikularen Zelloberfläche zeigt das Vorhandensein eines Retentionsmechanismus zwischen Flagellartasche und pellikularer Zellmembran.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist aber nicht geklärt, ob bei der Retention von EP1:GFP und TfR durch den selben Sortierungsmechanismus stattfinden. Eine Retention allein aufgrund des einzelnen GPI-Ankers ist unwahrscheinlich, da ein Fusionsprotein, welches aus VSG221 und GFP besteht und dieses als Domäne oberhalb des VSG-Mantels lokalisiert, trotz erfolgreicher Dimerisierung eine mit EP1:GFP vergleichbare Lokalisation in Endosomen und Flagellartasche aufweist (Engstler, persönliche Mitteilung).

Trotz dieses ungeklärten Phänomens ist EP1:GFP als Reporter für die Darstellung der Transportwege von GPI-verankerten Proteinen geeignet, da hierfür die intrazelluläre Lokalisation entscheidend ist. Die hohe Komplexität der Struktur von VSGs erschwert die Abschätzung, welche Modifikationen möglich sind, ohne den gesamten Domänenaufbau zu stören. Im Fall von VSG117:GFP wurde die Lokalisation stark beeinträchtigt. Insofern ist VSG, welches zunächst als bestmöglicher Reporter scheint, zur Zeit nur begrenzt für ein Assay zum Transport von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei* geeignet. EP1 hingegen kann ohne starke Auswirkungen auf die Lokalisation mit GFP verbunden werden. Gerade der Fakt, dass das Molekül als Monomer vorliegt und einen im Vergleich zu VSG einfachen Domänenaufbau aufweist, prädestiniert es zu einem guten Markerprotein und zur Untersuchung der intrazellulären Transportwege in *T. brucei*.

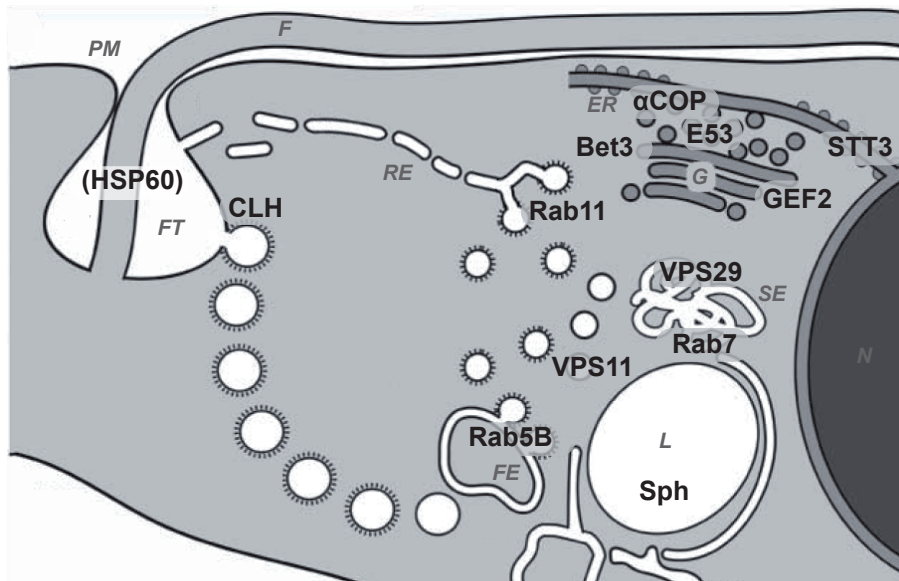
### **5.3. Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Protein in *T. brucei***

Das fluoreszierende GPI-verankerte Markerprotein EP1:GFP sollte die Analyse von Zellen nach Induktion von RNAi ermöglichen und die Charakterisierung des intrazellulären Transportweges von GPI-verankerten Proteinen ermöglichen. Abbildung 63 gibt eine Übersicht über die durch RNA-Interferenz herunterregulierten Proteine sowie die ungefähre Lokalisation, an der EP1:GFP nach Induktion nachgewiesen werden konnte.

Eine ganze Anzahl der ausgeschalteten Proteine sind am Transport von EP1:GFP zum Golgi-Apparat beteiligt, wobei es sich vermutlich nicht ausschließlich um Komponenten des biosynthetischen Transportweges handelt.

Die Funktion des Coatamerproteins  $\alpha$ COP konnte durch die Expression von EP1:GFP näher bestimmt werden. Als Untereinheit des COP I-Komplexes ist  $\alpha$ COP eins der bekanntesten Proteine, welche die Bildung von Vesikeln steuern. Bezüglich der genauen Bestimmung der mit dem Coatamer COP I bedeckten Vesikel sind verschiedene Funktionen postuliert worden, die auf zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen beruhen. Es wird angenommen, dass COP I-Vesikel am retrograden Transport von Transmembranrezeptoren vom *cis*-Golgi zum ER beteiligt sind (Hauri *et al.*, 2000). Außerdem ist COP I vermutlich beim anterograden Transport von tubulären Transportcarriern zum Golgi beteiligt (Shima *et al.*, 1999).

Der *knock down* von der COP I-Untereinheit  $\alpha$ COP führte in *T. brucei* zu einem Rückstau von EP1:GFP im ER. Demnach findet der Export von GPI-verankerten Proteinen aus dem



**Abb. 63: Übersicht über die für die RNA-Interferenz ausgewählten Proteine und ihre vermutete Lokalisation in *T. brucei*.** Die Zielproteine wurden anhand des Wirkungsbereichs ihrer orthologen Proteine ihrer vermuteten Lokalisation zugeordnet. CCV: clathrinbedeckte Vesikel; CHC: clathrin heavy chain; ER: endoplasmatisches Retikulum; tER: transitierendes ER; ERG53: ERGIC-53; F: Flagellum; FE: frühe Endosomen; FT: Flagellartasche; G: Golgi-Apparat; L: Lysosom; N: Nukleus; PM: Plasmamembran; RE: recycling Endosomen; SE: späte Endosomen; VPS: vacular protein sorting;

ER in *T. brucei* in Abhängigkeit von COP I statt. Gleichzeitig weisen diese Zellen jedoch die unveränderte Lokalisation der transmembrangebundenen sauren Phosphatase auf, die normalerweise mit EP1:GFP im endosomalen System colokalisiert. Die saure Phosphatase ist im Rahmen eines anderen Projektes durch RNAi herunterreguliert worden (Engstler *et al.*, 2005b). Aus den Ergebnissen lässt sich die Halbwertszeit des Proteins mit 9,5 h unter der Voraussetzung der vollständigen Repression der Neusynthese ermitteln. Die Zellen wurden nach 18 h Induktion des *knock downs* von αCOP untersucht und demnach wurden etwa 25% der transmembrangebundenen sauren Phosphatase nach Induktion der Interferenz neusynthetisiert. Trotzdem konnte kein Rückstau der Phosphatase im ER festgestellt werden. Der anterograde Transport des Transmembranproteins ist also durch die RNAi kaum in Mitleidenschaft gezogen worden.

Diese Trennung von Transmembranproteinen und GPI-verankerten Proteinen in unterschiedliche Vesikel bei Austritt aus dem ER entspricht den Beobachtungen in der Hefe (Sütterlin *et al.*, 1997), wobei hier allerdings zwei unterschiedliche Arten von COP II-Vesikeln postuliert wurden.

Die Halbwertszeit von EP1:GFP beträgt 3,5 h (Engstler und Boshart 2004). Bei der untersuchten Induktionszeit sind deshalb etwa 5-6 Halbwertszeiten von EP1:GFP verstrichen, so dass es sich um >95% nach Einsetzen der RNA-Interferenz synthetisiertes Protein handelt, da nur etwa 5% des EP1:GFP vor dem Einsetzen der Interferenz unbeeinträchtigt den Golgi-Apparat passieren konnte. Deshalb kann keine Aussage über die Funktion von COP I nach



Passieren des Golgi-Apparates gemacht werden. Für die Hefe ist die Rolle von COP I beim Transport von frühen Endosomen zum *trans*-Golgi-Apparat postuliert worden, da die Ausschaltung des TRAPP II-Komplexes zu einer Delokalisation der  $\gamma$ -Coatamer-Untereinheit führt (Cai *et al.*, 2005). Da der TRAPP-Komplex auch in *T. brucei* am *trans*-Golgi-Apparat bei dem Transport von GPI-verankerten Proteinen mitwirkt, ist eine Funktion von COP I auch in diesem Bereich durchaus möglich.

In der Annahme, dass der Mechanismus von COP I in *T. brucei* konserviert ist, könnte das Vorhandensein von homologen Genen von bekannten Interaktionspartnern des Coatamers in der Hefe Hinweise auf die Funktion des Coatamers in *T. brucei* bieten. Als möglicher Interaktionspartner für die Untereinheiten des COP I-Komplexes kommt das Protein Erv25p (Belden und Barlowe 1996) in Frage, welches in der Hefe präferentiell COP I bindet. *T. brucei* verfügt mit Tb09.244.2760 über ein wahrscheinliches Ortholog, dessen C-terminale Sequenz eine hohe Übereinstimmung zur Sequenz von Erv25p aufweist (54% Identität bei den zytosolischen C-terminalen 11 AS verglichen mit 16% Identität der gesamten Sequenzen). Die Identität des orthologen Proteins ist allerdings sehr unsicher, da das sowohl mit COP I als auch mit COP II interagierende Protein Emp24p eine ähnlich hohe Homologie aufweist und es sich bei Tb09.244.2760 um *TbEmp24* handeln kann. Während Emp24 vor allem beim anterograden Transport aus dem ER eine Rolle spielt, ist Erv25p eher in den retrograden Transport vom *cis*-Golgi-Apparat zum ER involviert. Da die Identifizierung und genaue Funktion der bei der Bildung der COP I-Vesikel beteiligten Proteine in *T. brucei* noch aussteht und die vorläufige Identifizierung nach BLAST-Analyse zu keinen eindeutigen Hinweisen führt, können zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine weiterführenden Vermutungen über die Rolle von COP I-Vesikeln in *T. brucei* angestellt werden.

Eine weitere Frage ist die der Gewichtung zwischen COP I-abhängigen und COP I-unabhängigen anterogradem Transport zwischen ER und *cis*-Golgi-Apparat und des retrograden Transportes zurück in das ER. Im Golgi-Apparat liegt VSG 2,7-fach konzentrierter als im ER vor (Grünfelder *et al.*, 2002). Dies könnte nach der positiven Sortierung von GPI-verankerten Proteinen in COP I-Vesikel durch die erhöhte Anzahl an COP I-Vesikel erreicht werden. Ebenso könnte dieser Effekt auf den verstärkten Rücktransport von Membranmaterial, in dem kein VSG verankert ist, zum ER beruhen. Ein solcher negativer Sortierungsmechanismus zur Aufkonzentrierung von VSG vor der Exozytose ist für die Bildung der exozytischen Carrier (EC) postuliert worden (Overath und Engstler 2004). Hierbei bildet der dichte VSG-Mantel auf der lumenalen Seite der Vesikelmembran eine natürliche Zielkonzentration an VSGs. Da zwischen den EC und dem Golgi-Apparat allerdings immer noch ein Konzentrationsgefälle von 1:4 liegt, stellt sich die Frage, wie und ob die Konzentration von VSGs in den Golgi-Zisternen gemessen und reguliert wird, da die

geringere Konzentration an VSGs sterisch viel Raum zwischen den einzelnen Molekülen lässt.

Die an den Sortierungsprozessen vermutlich beteiligten *peri*-Golgi-Vesikel sind in Säugerzellen mit COP I bedeckt (Martinez-Menárguez *et al.*, 2001). In *T. brucei* sind diese Vesikel allerdings noch nicht näher charakterisiert worden.

Aufgrund der RNA-Interferenz konnte die Rolle von COP I bei dem anterograden Transport zum *cis*-Golgi-Apparat gezeigt werden. Die weiteren möglichen Funktionen von COP I beim retrograden intra-Golgi-Transport sowie beim Transport zwischen Endosomen und *trans*-Golgi-Apparat können aufgrund der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden und müssten durch den Nachweis der Interaktion von COP I bspw. mit dem TRAPP II-Komplex nachgewiesen werden.

Trotz des breiten Bindungsspektrums von ERGIC-53 (Kamiya *et al.*, 2008) lässt sich in *T. brucei* keine Auswirkung des Fehlens von TbERGIC auf das Trafficking des EP1:GFP nachweisen. Dies entspricht allerdings auch der Vermutung, dass die bindende Domäne von ERGIC-53 sterisch von der Membran entfernt ist (Hauri, persönliche Mitteilung) und somit eine Interaktion zwischen Lektin und GPI-Anker nur schwer möglich wäre.

Der TRAPP-Komplex fungiert in der Hefe als Guaninnukleotidaustauschfaktor für die kleine GTPase Ypt1 (Jones *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000a) und spielt vermutlich eine Rolle als *tethering*-Faktor für COP II-Vesikel (Sacher *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2007). Die deutliche Lokalisation von EP1:GFP nach Interferenz gegen die Sequenz der Untereinheit des TRAPP-Komplexes TbBet3 hinter dem Golgi-Apparat lässt auf die Beteiligung eines der beiden TRAPP-Komplexe zumindest an einem späteren Punkt des Transportweges von EP1:GFP in *T. brucei* schließen. Insbesondere die vollständige Lokalisation von EP1:GFP an einem Punkt nahe dem *trans*-Golgi-Apparat könnte darauf hindeuten, dass das betroffene Kompartiment auch bei dem Recycling von EP1:GFP zwischen Endosomen und Flagellartasche beteiligt ist und die Akkumulation nicht ausschließlich im sekretorischen Transportweg stattfindet. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Ausschaltung von trs120 in der Hefe gemacht, die zu einer Blockierung des Recycling durch die frühen Endosomen führte, wobei die Sekretion der Invertase zum Teil beeinträchtigt wurde (Cai *et al.*, 2005). Diese Blockierung war unabhängig vom Carboxypeptidase Y (CPY)-Transportweg, der nach wie vor unbeeinträchtigt funktionierte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Blockierung des Transportes aus dem *trans*-Golgi-Apparat heraus und eine auf den sekretorischen Transportweg begrenzte Funktion. In der Hefe ist die Untereinheit trs130 des TRAPP II-Komplexes an diesem Transport beteiligt (Jedd *et al.*, 1997; Sacher *et al.*, 2000). In diesem Fall wäre allerdings eine verstärkte Lokalisation von EP1:GFP im Golgi-Apparat und ER wahrscheinlich.



Aufgrund der Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie kann nicht entschieden werden, ob der Export aus dem *trans*-Golgi-Apparat blockiert wird oder die Fusion mit dem hinter dem Golgi-Apparat gelegenen endosomalen Kompartimenten beeinträchtigt wird. Diese endosomalen Kompartimente bilden das *trans*-Golgi-Netzwerk in *T. brucei* (O. Karo, Diplomarbeit). Ebenso kann zu diesem Zeitpunkt nicht entschieden werden, ob lediglich das Recycling von EP1:GFP betroffen ist oder bereits der Transport von neusynthetisiertem EP1:GFP zur Zelloberfläche.

Das Retromer dient in Säugerzellen zur Rückgewinnung der Mannose-6-Phosphatrezeptoren aus den späten Endosomen und transportiert diese zum Golgi-Apparat. Der *knock down* der Retromerkomponenten *HsVPS26* und *HsVPS35* in HeLa-Zellen führte zur Sekretion von sauren Hydrolasen ins Medium sowie zum verstärkten Transport des Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphatrezeptors ins Lysosom (Arighi 2004). Die RNA-Interferenz gegen *TbVPS29* führte allerdings zu der Akkumulation von EP1:GFP zwischen Lysosom und Zellkern nahe dem *trans*-Golgi-Apparat. Diese Akkumulation findet außerhalb der späten Endosomen statt, da die dazugehörigen Membranen nicht durch Rab7 dekoriert werden. Auch endozytiertes VSG colokalisiert nicht mit dem akkumulierten EP1:GFP. Der *knock down* von *TbVPS29* führt also zu einer Trennung von EP1:GFP und endozytiertem VSG. In durch RNAi unbeeinflussten Zellen colokalisiert EP1:GFP nur zu 90%-95% mit endozytiertem VSG (Engstler und Boshart 2004). Im ER und Golgi-Apparat verbleiben etwa 4% des gesamten EP1:GFPs (Grünfelder *et al.*, 2002). Insgesamt bleiben dadurch 1-6% des EP1:GFP übrig, welche sich weder im ER befinden noch mit endozytiertem VSG colokalisiert sind. Das durch *knock down* von *TbVPS29* sichtbar gewordene Kompartiment beinhaltet in unbeeinflussten Zellen möglicherweise diesen von VSG getrennten Anteil an EP1:GFP.

Aufgrund der Funktion von *HsVPS29* ist zu vermuten, dass dieser Sortierungsprozess zwischen VSG und EP1:GFP im spät-endosomalen Kompartiment stattfindet. Nur ein Teil (58%) des spät-endosomalen Kompartimentes wird durch VSG erreicht (Engstler *et al.*, 2004). Zudem findet in diesem Kompartiment vermutlich auch die Trennung von antikörpergebundenem VSG von VSG statt, da internalisierte Antikörper im Lysosom abgebaut werden (O'Beirne *et al.*, 1998). Die Komponenten des Retromers colokalisieren zumindest in Säugerzellen mit Rab7. Zudem binden die Untereinheiten *in vitro* an Rab7 (Rojas *et al.*, 2008). Die tubulären Ausläufer, die zum Teil bei dieser EP1:GFP-positiven Struktur zu sehen sind, könnten ebenfalls ein Hinweis auf die spät-endosomale Herkunft dieses Kompartimentes sein, da die Komponenten des Retromers in Säugerzellen tubuläre Strukturen bei der Sortierung von Mannose-6-Phosphatrezeptoren ausbilden (Arighi 2004; Popoff *et al.*, 2007). Sofern diese tubulären Strukturen identisch sind mit den nach *knock down* von *TbVPS29* durch EP1:GFP sichtbar werdenden Ausläufern, wäre *TbVPS29*

nicht für die Bildung der tubulären Transportcarrier an sich notwendig, sondern nur für den Weitertransport aus diesem Kompartiment bzw. für die Fusion der entstehenden Transportcarrier mit der Ziellmembran am *trans*-Golgi-Apparat.

Möglicherweise ist die Bildung der Transportcarrier in *T. brucei* nur von einigen Untereinheiten des Retromerkomplexes abhängig. Die Bildung des Komplexes aus den unterschiedlichen Retromer-Untereinheiten in Säugerzellen ist nur bedingt von *HsVPS29* abhängig. Die beiden Untereinheiten *HsVPS26* und *HsVPS35* interagieren direkt und *HsVPS29* ist nicht notwendig für die Bildung des Heterodimers (Hierro *et al.*, 2007), allerdings ist *HsVPS29* vermutlich bei der Bindung der sortierenden Nexine beteiligt, welche die Membranbindung ermöglichen (Collins *et al.*, 2005a). Ob *TbVPS29* eine identische Funktion aufweist ist aufgrund der hohen Divergenz der C-terminalen Proteinsequenz allerdings in Frage zu stellen. Die Ausbildung des Retromers ohne *TbVPS29* ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt weder widerlegbar noch beweisbar.

Die Akkumulation von EP1:GFP nach *knock down* von *TbVPS29* geht allerdings nicht unbedingt auf reendozytiertes EP1:GFP zurück. Ebenso gut kann es sich um neusynthetisiertes EP1:GFP handeln. Somit würde *TbVPS29* nicht notwendigerweise eine für EP1:GFP spezifische Rolle während des Recyclings spielen, sondern beim Trafficking im biosynthetischen Transportweg essentiell sein. Für diese Annahme könnte die Lokalisation zwischen Lysosom und Nukleus sprechen.

Die Nähe zum *trans*-Golgi-Apparat lässt in jedem Fall auf eine bislang nicht bekannte Funktion von VPS29 schließen, da nach bisherigen Kenntnissen ein Rückstau von EP1:GFP in späten Endosomen und der verstärkte Transport ins Lysosom zu vermuten gewesen wären. Ob dies eine spezielle Eigenheit beim Transport von GPI-verankerten Proteinen darstellt oder eine Besonderheit des Retromers in *T. brucei* kann an dieser Stelle nicht abschließend beantwortet werden.

In der Hefe wird der Transmembranrezeptor VPS10 des CPY-Transportweges durch das Retromer transportiert, in Säugerzellen die beiden Mannose-6-Phosphatrezeptoren. Bisher konnten im Genom von *T. brucei* keine homologen Sequenzen zu den Sequenzen dieser drei Transmembranproteine gefunden werden. Da die Hauptaufgabe des Retromers in Säugerzellen und Hefe der Rücktransport dieser Rezeptoren zum *trans*-Golgi-Apparat ist, deutet dies entweder auf eine zusätzliche, bislang unbekannte Funktion des Retromers beim Transport GPI-verankerter Proteine oder auf eine in *T. brucei* spezielle Funktion des Retromers hin, welche in anderen eukaryotischen Zellen durch andere Transportcarrier erfüllt wird.

Ein Möglichkeit wäre eine Rolle des Retromer-Proteinkomplexes im zum alkalischen Phosphatase-Weg analogen Transportweg in *T. brucei*. In der Hefe ist das Adapterprotein AP-3 beim Transport der GPI-verankerten alkalischen Phosphatase involviert, welches in Säugerzellen sowohl clathrinabhängig wie clathrinunabhängig an Transportmechanismen

beteiligt ist (Faúndez *et al.*, 1998; Dell'Angelica und Payne 2001). Dieser Transportweg ist in der Hefe allerdings unabhängig von den Komponenten des Retromer-Komplexes und verbindet direkt die Vakuole mit dem späten Golgi-Apparat.

Die Sequenz von TbAP-3 ist annotiert, die alkalische Phosphatase hingegen nicht identifizierbar. Bei dem tatsächlichen Vorhandensein dieses Transportweges in *T. brucei* stellt sich also auch bei diesem Transportweg die Frage nach den transportierten Proteinen. Somit steht eine eingehende Charakterisierung der Transportwege vom spätendosomalen Kompartiment zum *trans*-Golgi-Apparat in *T. brucei* noch aus, um diese deutlichen Abweichungen von den bekannten Transportwegen in Hefe und Säugerzellen aufzuklären.

Zwar können die Komponenten des Retromers als solches in *T. brucei* durch BLAST-Analyse leicht identifiziert werden, aber die genaue Funktion ist ungeklärt. Die Transmembranrezeptoren wie die Mannose-6-Phosphatrezeptoren, Sortilin/VPS10 oder die Dipeptidylaminopeptidase A, welche durch das Retromer wieder dem Golgi-Apparat zugeführt werden, sind in der Hefe und im Menschen charakterisiert worden, konnten in *T. brucei* bislang aber noch nicht identifiziert werden.

Im ER werden Oligosaccharide auf die Asparaginreste der naszierenden Proteinketten durch die Oligosaccharyltransferase übertragen. Diese N-Glycosylierungen spielen in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle durch Calnexin und Calreticulin im ER (Caramelo und Parodi 2008). Allerdings ist nachgewiesen worden, dass *T. cruzi* lediglich nicht-glycosylierte Mannose-Dolichol-Derivate herstellt (de la Canal und Parodi 1987), so dass die Glucosylierung der Mannosereste erst nach Übertragung des Oligosaccharids auf das Protein erfolgt (Jones *et al.*, 2004). *T. brucei* besitzt außerdem lediglich Calreticulin, während Calnexin vermutlich durch sekundären Genverlust verloren gegangen ist (Banerjee *et al.*, 2007). Demnach verfügt *T. brucei* nur über eine einfachere Qualitätskontrolle durch Glycosylierungen durch nur ein Lektin.

Außerdem spielt die N-Glycosylierung bei dem Transport zur apikalen Zellmembran in Epithelzellen vermutlich eine wichtige Rolle (Hara-Kuge *et al.*, 2002; Vagin *et al.*, 2009). In *T. brucei* weisen fast alle VSGs N-Glycosylierungsstellen auf mit Ausnahme einiger weniger Sequenzen, deren Expression und Funktionalität allerdings keinesfalls gesichert ist (N. Jones, persönliche Mitteilung). Von den Prozyklinen weisen lediglich die Isoformen EP2 und GPEET keine N-Glycosylierungsstellen auf (Acosta-Serrano *et al.*, 1999).

Der *knock down* der Oligosaccharyltransferase und damit die generelle Verhinderung von N-Glycosylierungen führen in *T. brucei* zu einer deutlichen Oberflächenlokalisierung von EP1:GFP jenseits der Flagellartasche. Da die nichtglycosylierte Variante von EP1:GFP nicht die Oberfläche erreicht, spricht alles dafür, dass N-Glycosylierungen bei dem Sortierungsmechanismus, welcher EP1:GFP von der pellikularen Zelloberfläche abhält, eine wichtige Rolle spielen. Die Carbohydratmatrix der Flagellartasche besteht zu einem

großen Anteil aus dichtgepackten N-Glycosylierten Proteoglycanen (Atrih *et al.*, 2005). VSG passiert bei der Exozytose auch das Lumen der Flagellartasche (Grünfelder *et al.*, 2002). Auch EP1:GFP kommt im Lumen der Flagellartasche vor und sammelt sich dort nach *knock down* der schweren Clathrin-Untereinheit an. Somit können entweder die Glycanmatrix der Flagellartasche oder speziell die Glycosylierung der Proteine an der Austrittsregion des Flagellums aus der Flagellartasche hierfür entscheidend sein. Der anhaltende Ausschluss von EP1:GFP von der Oberfläche bei der Ausschaltung von Clathrin könnte allerdings eher auf Letzteres hinweisen, da das wachsende Volumen der Flagellartasche in diesen Zellen eine vermehrte Synthese der jeweiligen Proteoglycane erfordert, um die notwendige Dichte der Matrix zu erhalten. Da die Zellen allerdings nicht mehr endozytieren können, liegen vermutlich sowohl eine Energiedefizienz als auch ein Mangel an Glukose und Galaktosebausteinen vor. Die hemidesmosomale Region am Austrittspunkt des Flagellums aus der Flagellartasche wird lediglich während der Zytokinese vergrößert.

Die verstärkte Lokalisation von EP1:GFP auf dem Flagellum ist konsistent mit dem Transport von VSG entlang des Flagellums auf der pellikularen Zelloberfläche (M. Engstler, persönliche Mitteilung). Die verbliebene intrazelluläre Lokalisation von EP1:GFP weist darauf hin, dass der Sortierungsmechanismus nicht komplett ausgeschaltet wird. Der *knock down* der Oligosaccharyltransferase beeinflusst lediglich die Saturierbarkeit des Sortierungsmechanismus.

Der Transportweg von VSG und EP1:GFP zur Flagellartasche ist ungeklärt. Der TRAPP II-Proteinkomplex ist vermutlich bei der Abschnürung der Vesikel vom TGN eine Rolle spielt und an dem Transport von EP1:GFP zur Flagellartasche beteiligt. Die Konzentrierung von VSG findet vermutlich durch negative Sortierung statt (Overath und Engstler 2004) und könnte an die Bildung von Rab11-positiven *exocytic carrier* in den *recycling endosomes* gekoppelt sein. Die zunehmende Lokalisation von EP1:GFP in Rab5A-positiven frühen Endosomen bei *knock down* von *TbRab11* zeigt, dass der Transport von EP1:GFP bei den *recycling* Endosomen von Rab11 abhängt. Dies betrifft nicht nur die Bildung der *exocytic carrier*, sondern auch den Transport von EP1:GFP in die *recycling* Endosomen. Auch das Recycling von lumenalen Proteinen hängt von Rab11 ab (Jeffries *et al.*, 2001).

Der *knock down* von Rab11 führt allerdings nicht dazu, dass neusynthetisiertes VSG von der Zelloberfläche ausgeschlossen wird (Jeffries *et al.*, 2001). Zudem steht der Endozytose durch die runden CCV I-Vesikel die Exozytose der flachen *exocytic carrier* entgegen. Die *exocytic carrier* weisen verglichen mit den CCV I-Vesikeln ein höheres Oberfläche/Volumen-Verhältnis auf, was bei gleichbleibendem Zellvolumen und Zelloberfläche entweder die Verdichtung des Materials im Vesikellumen oder einen alternativen Exozytoseweg impliziert (Overath und Engstler 2004). In den Tomogrammen von *T. brucei* fanden sich allerdings bislang keine Hinweise auf Transportvesikel eines solchen alternativen Exozytosewegs

(M. Engstler, persönliche Mitteilung). Eine solche alternative Exozytoseroute würde nach dieser Datenlage neusynthetisiertes VSG zur Flagellartasche befördern und die Sekretion von voluminöser Fracht ermöglichen. Ob diese beiden Funktionen durch denselben Transportweg oder zwei separate Mechanismen stattfinden, kann zur Zeit jedoch nicht konkretisiert werden.

Die genaue Funktion von *TbRab11* kann bislang nicht hinreichend geklärt werden, da die exozytischen Carrier zwar mit *TbRab11* dekoriert sind, *TbRab11* aber nicht essentiell für die Exozytose von neusynthetisiertem VSG ist. Gleichzeitig ist *TbRab11* offenbar entscheidend für den Transport von Membran zu den *recycling* Endosomen.

Zur Klärung der differenzierten Transportwege von *recycling* VSG und neusynthetisiertem VSG sind eine ganze Anzahl von nachfolgenden Experimenten notwendig. Insbesondere die Aufklärung der genauen Trafficking Route und dem Ort der Konvergenz beider Transportwege sind hier notwendig, um die scheinbar widersprüchlichen Funktionen von *TbRab11* zu klären. Eine offene Frage ist auch die genaue Lokalisation von EP1:GFP in den *exocytic carrier*. Die dichte Packung des VSG sowie die geringe Höhe werfen die Frage auf, ob EP1 oder EP1:GFP sich überhaupt sterisch in den VSG-Mantel der Vesikel einfügen kann.

Die hochkonservierten ARF-Proteine erhalten in Säugerzellen ihre Spezifität primär durch die selektive Rekrutierung an Zielmembranen durch spezifische GEFs und andere akzessorische Proteine. Die strukturelle Gemeinsamkeit dieser GEFs ist die sec7-Domäne, welche in allen 15 humanen GEFs auftritt (Casanova 2007). In *T. brucei* ist die Sec7-Domäne durch BLAST-Suche nur in drei Proteinsequenzen vorhersagbar. Da diese Domäne ansonsten sehr stark konserviert ist, ist es unwahrscheinlich, dass es noch weitere GEFs der Sec7-Proteinfamilie in *T. brucei* gibt.

Die Delokalisation von EP1:GFP über die Zelle nach Induktion der RNA-Interferenz gegen *TbGEF2* zeigt deutlich die grundlegende Funktion dieses GEFs bei Erhalt und der Ausbildung der unterschiedlichen Membranstrukturen und Organellen. Da bei der Ausschaltung eines GEFs ein spezifischer Effekt durch die Blockierung eines ARFs an einem einzelnen, konkreten Kompartiment zu erwarten gewesen wäre, sind in *T. brucei* vermutlich weitere akzessorische Proteine an diesen Prozessen beteiligt, welche die Spezifität der ARFs über die Identität der GEFs hinaus bestimmen. Genauere Untersuchungen zu diesem Thema müssten allerdings zunächst Interaktionspartner der GEFs und der ARFs in *T. brucei* identifizieren.

Der *knock down* von Clathrin in Hühner B-Zellen zeigte, dass Clathrin zwar auch in diesen Zellen bei der Endozytose beteiligt ist, allerdings ist das Recycling des Transferrinrezeptors in diesen Zellen kaum beeinträchtigt (Wetley *et al.*, 2002).

Es ist postuliert worden, dass der *knock down* von Clathrin mittels RNAi durch die physische Belastung zum Zelltod in BSF und prozyklischen Trypanosomen führt (Allen *et al.*, 2003). Die starke Vergrößerung der Flagellartasche impliziert gleichzeitig den Materialverlust der Zelle durch die Sekretion der zusätzlichen Matrixglycane, die das Lumen der Flagellartasche anfüllen. Diese Matrix ist auch in RNAi induzierten Zellen intakt in EM-Aufnahmen erkennbar. Die lumenale Lokalisation des GPI-verankerten EP1:GFP wirft die Fragen auf, wie sich die GPI-Anker im Lumen sterisch anordnen, wie die GPI-verankerten Proteine in das Lumen gelangen und letztlich wie sie zurück in die Membran gelangen. Der Austritt aus der Membran ist aufgrund der starken Beugung der Membran bei Fusion der *exocytic carrier* möglich. Weiterhin ist eine Anordnung in Micellen im Lumen der Flagellartasche möglich. Der Rückeintritt der Moleküle in die Plasmamembran ist allerdings nach wie vor unklar und könnte möglicherweise mit dem Ausschluss von nicht-VSGs von der Zelloberfläche zusammenhängen.

Die molekulare Maschinerie bei der Endozytose in *clathrin coated pits* unterscheidet sich in *T. brucei* signifikant von den bekannten Mechanismen in Säugerzellen. Zum einen ist der Adapterkomplex 2, der bei Säugerzellen eine entscheidende Rolle bei der Sortierung des endozytierten Materials spielt, im Genom von *T. brucei* nicht identifizierbar (Morgan *et al.*, 2002). Hinzu kommt, dass der *knock down* des orthologen Proteins von Epsin weder zu einem ähnlichen Phänotyp wie der *knock down* von Clathrin noch überhaupt zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Populationswachstums in BSF führte (Heddergott, Diplomarbeit). Allerdings ist die Identifikation des Proteins als *TbEpsin* nicht gesichert, da das mutmaßlich orthologe Protein stark verkürzt ist und fast ausschließlich aus der N-terminalen ENTH-Domäne besteht.

In Säugerzellen ist das Protein Dynamin an der Abschnürung der Vesikel beteiligt (van der Blik und Meyerowitz 1991). In *T. brucei* hat das Dynamin-ähnliche Protein keine nachweisbare Funktion bei der Endozytose, sondern bei der Teilung des Mitochondriums (Morgan *et al.*, 2004). Auch die ausgesprochen hohe Endozytoserate in *T. brucei* (Engstler *et al.*, 2004) zeigt, dass der Prozess der clathrinvermittelten Endozytose in *T. brucei* bezüglich der Endozytosegeschwindigkeit extrem optimiert ist und sich deshalb vermutlich auch mechanisch von dem bekannten Prozess in Säugerzellen unterscheidet.

Die Frage, inwieweit Clathrin in *T. brucei* an dem Transport zwischen den verschiedenen endosomalen Kompartimenten und vom Golgi-Apparat zu den Endosomen beteiligt ist, kann durch RNAi nicht beantwortet werden. In Säugerzellen spielt Clathrin eine Rolle beim Transport vom Golgi-Apparat zum endosomalen Kompartiment (Costaguta *et al.*, 2001). In *T. brucei* ist Clathrin außerdem beim Transport zwischen den einzelnen Endosomen involviert, da *clathrin coated vesicles* Klasse II nahe dem endosomalem Kompartiment nachgewiesen wurden (Grünfelder *et al.*, 2003). Die Funktion dieser Vesikel ist allerdings abgesehen davon, dass sie kein VSG transportieren, nicht geklärt.



Da die Adapterproteine 1, 3 und 4 in der Datenbank annotiert wurden, ist ihre Existenz in *T. brucei* anzunehmen. Eine konventionelle Funktion des Clathrins im endosomalen Kompartiment und am *trans* Golgi-Apparat mithilfe dieser Proteine ist möglich, auch wenn eine Bindung von AP3 an Clathrin zumindest für Hefe in Zweifel zu ziehen ist (Yeung *et al.*, 1999). Zudem haben bisherige Untersuchungen gezeigt, dass auch in der Hefe die Funktion des Clathrins unabhängig von Adapterproteinen ist (Lemmon und Traub 2000).

Rab5 gilt nicht nur als Marker für frühe Endosomen und ist eins der am besten charakterisierten Rab-Proteine (Pfeffer und Aivazian 2004), sondern ist vermutlich auch maßgeblich an der Endozytose in prozyklischen *T. brucei* beteiligt (Hall *et al.*, 2004). Durch die Colokalisation von dem Transmembranprotein ISG100 mit Rab5B und andererseits endozytierten GPI-verankerten Proteinen mit Rab5A liegt der Verdacht nahe, dass diese beiden Isoformen auch an der intrazellulären Sortierung von Membranproteinen beteiligt sein könnten. Da ein spezifischer Transport sowohl zu den späten als auch zu den *recycling* Endosomen stattfindet (Engstler *et al.*, 2004), wird an diesem Punkt das endozytierte Material vermutlich sortiert. An diesem Prozess könnten die beiden Isoformen von Rab5 durchaus beteiligt sein.

Der *knock down* von Rab5B führte zu globulären Strukturen, die sich nahe der Flagellartasche am Flagellum befinden. Diese Strukturen sind vermutlich *blebs*, welche möglicherweise durch die Störung des Membrangleichgewichtes entstehen, bei dem Rab5B eine wichtige Rolle spielen könnte. Auffällig ist auch das Fehlen von EP1:GFP in diesen Liposomen. Aufgrund ihrer Nähe zur Flagellartasche ist zu vermuten, dass sie aus der Plasmamembran stammen und bei der Vesikelbildung EP1:GFP ebenso wie von der pellikularen Zellmembran ausgeschlossen wird. Der genaue Mechanismus sowie die exakte Funktion von Rab5B bei diesem Prozess erfordern allerdings noch eingehendere Untersuchungen.

Denkbar ist beispielsweise, dass der Mangel an Rab5B lediglich einen Rückstau des Membranmaterials zur Flagellartasche verursacht. Die Unterschiede zu dem Phänotyp nach der RNA-Interferenz gegen Clathrin deuten auf einen anderen Mechanismus hin als lediglich die Ansammlung von Membranmaterial in der Flagellartaschenmembran. Die Bildung der globulären Liposomen könnte durch die stark beeinträchtigte Membransymmetrie verursacht werden. Ebenfalls möglich ist der intrazelluläre Überschuss an Membran, welche nicht VSG oder EP1:GFP trägt. Aufgrund welcher Mechanismen dieses Membranmaterial allerdings in die Flagellartasche und nach draußen gelangt ist zur Zeit kaum nachzuvollziehen.

Durch die biphasische Kinetik des Transportes von VSG zum spätendosomalen Kompartiment (Grünfelder *et al.*, 2003) nimmt dieses Kompartiment eine besondere Stellung unter den hier in dieser Arbeit näher betrachteten Kompartimenten ein. VSG erreicht dieses Kompartiment

vermutlich sowohl direkt von den frühen Endosomen wie von den *recycling* Endosomen aus.

Während Rab5 für das frühe endosomale Kompartiment charakteristisch ist, dekoriert Rab7 das spätendosomale Kompartiment. Entscheidend für die Regulation dieser beiden GTPasen könnte die Konversion des CORVET-Tethering-Komplexes mit Bindung an ScRab5/VP521 in den HOPS-Tethering-Komplex mit Bindung an ScYpt7/Rab7 sein. Der *knock down* beider GTPasen sowie der zentralen Komponente der Tetheringkomplexe *TbVPS11* zeigte die Beteiligung aller drei Proteine bei dem Transport von EP1:GFP.

Die Ablation von *TbVPS11* als Komponente der Tethering-Komplexe führt dazu, dass EP1:GFP nicht mehr mit Rab7 colokalisiert ist und zwischen der Flagellartasche und dem Lysosom akkumuliert. Diese fehlende Colokalisation mit *TbRab7* lässt allerdings keine Rückschlüsse darüber zu, ob der beeinträchtigte Komplex dem CORVET- oder dem HOPS-Komplex entspricht.

Der Transport von GPI-verankerten Proteinen zu den späten Endosomen ist von *TbVPS11* und somit vermutlich von einem der beiden Tethering-Komplexe, deren Untereinheit *TbVPS11* ist, abhängig. Aufgrund des stark unterschiedlichen Phänotyps verglichen mit dem *knock down* von *TbRab7* ist vermutlich primär der Transport von EP1:GFP zu den späten Endosomen und somit der CORVET-Komplex betroffen. Die zum Teil auftretende Verteilung von EP1:GFP auf zwei Bereiche posterior und anterior vom Lysosom könnten sowohl auf den Transport von frühen Endosomen wie von *recycling* Endosomen schließen lassen. Allerdings müsste diese Vermutung durch eine sehr viel genauere Betrachtung des Induktionsverlaufs überprüft werden. Eine weitere Deutungsmöglichkeit wäre eine wechselnde Funktion des Tethering-Komplexes für den Transport von den frühen bzw. von den *recycling* Endosomen zu den späten Endosomen.

Diese Unterbrechung des Transportwegs der GPI-verankerten Proteine zu den späten Endosomen ist konsistent mit der Beobachtung, dass in *S. cerevisiae* VPS11 als Komponente des HOPS-Komplexes mit Ypt7/Rab7 interagiert (Collins *et al.*, 2005b). ScVPS11 gehört zu der Klasse C der VPS-Gene, deren Dysfunktion eine Fragmentierung der Vakuole hervorruft (Banta *et al.*, 1988; Peterson und Emr 2001). Diese Beobachtung kann für *T. brucei* nicht bestätigt werden, da auch nach 24 h Induktion das Lysosom in den meisten Zellen noch intakt ist.

Der Mangel an Rab7 führt in Säugerzellen zur gestörten Biogenese von Lysosomen und zur Akkumulation von späten autophagischen Vesikeln (Eskelinen 2005). Rab7 gilt nicht nur als Marker für späte Endosomen, sondern ist in Hefe vermutlich auch an dem Andocken von Vesikeln durch den HOPS-Komplex (Collins *et al.*, 2005b) beteiligt. Zudem interagiert Rab7 mit den Komponenten des Retromers *in vitro* (Rojas *et al.*, 2008).

Insofern ist Rab7 vermutlich sowohl am Transport zu den späten Endosomen hin als auch bei einem Transport von den späten Endosomen zum Golgi beteiligt. Die Phänotypen durch *knock down* von *TbRab7* bzw. durch *knock down* von *TbVPS29* unterscheiden sich allerdings deutlich. Die tubuläre, durch EP1:GFP sichtbare Struktur, die in lebenden Zellen nach *knock down* von *TbRab7* zu sehen ist, ist nicht durch Paraformaldehyd fixierbar. Vermutlich stehen die Endosomen unter einer Zugspannung, welche die Konservierung erschwert und bereits bei geringsten Brüchen zu einer Fragmentierung des Kompartimentes führt.

Eine weitere Frage ist, um welches Kompartiment es sich bei dieser Struktur handelt. Der *knock down* von *TbVPS29* führt zu einer Akkumulation von EP1:GFP nahe dem *trans*-Golgi-Apparat und nicht wie zu erwarten nahe dem Lysosom in den späten Endosomen selbst. Demnach spielt *TbVPS29* vermutlich keine essentielle Rolle bei der Entstehung der retrograden Vesikel zum Golgi-Apparat, sondern vielmehr beim Andocken und der Fusion dieser Vesikel mit dem Golgi-Apparat. Das Entstehen der retrograden Vesikel kann aber durchaus von *TbRab7* abhängen, da nach *knock down* von *TbRab7* keine ähnliche Verteilung von EP1:GFP wie bei den *TbVPS29*-defizienten Zellen beobachtet werden konnte.

Die längliche Struktur in den Rab7-defizienten Zellen könnte eine Akkumulation von EP1:GFP in den späten Endosomen darstellen, welche aufgrund der Membranansammlung in den späten Endosomen ihre ohnehin bereits vielfältige Morphologie verändern. Unter Umständen könnte es sich auch um *multivesicular bodies* (MVBs) oder eine Vorstufe dazu handeln, da diese ja aus dem spätendosomal Kompartiment entstehen. Vermutlich reguliert *TbRab7* den Weitertransport aus späten Endosomen, so dass entweder ein alternativer, *TbRab7* unabhängiger Transport vermehrt stattfindet oder das späte endosomale Kompartiment selbst durch den Rückstau vergrößert wird.

Der *knock down* von *TbVPS11* führt zu einem gänzlich anderen Phänotyp als der von Rab7, da vermutlich der Transport zum spätendosomal Kompartiment blockiert wird. Unter Umständen ist bereits der Transport bei den frühen Endosomen beeinträchtigt, da *TbVPS11* als Bestandteil eines CORVET-Komplexes an diesem Punkt bereits eine Rolle spielen könnte. *TbRab7* hingegen scheint keine Rolle bei der Fusion von Vesikeln mit den späten Endosomen zu spielen, sondern eher bei dem Transport aus den späten Endosomen heraus.

Der Einsatz des GPI-verankerten Markerproteins erleichterte jedoch nicht in allen Fällen die Analyse des Phänotyps. Beispielsweise im Fall der sauren Sphingomyelinase konnte die Lokalisation von EP1:GFP nach Induktion der RNA-Interferenz kaum zur Aufklärung der Funktion des Proteins beitragen.

Die Spaltung von Sphingomyelin aus endozytierten LDL-Partikeln durch die saure Sphingomyelinase ist in *T. brucei* der einzige Weg Ceramide herzustellen (Coppens *et al.*, 1995). Der *knock down* der sauren Sphingomyelinase mittels RNA-Interferenz ist letal und

führt zur schweren Beeinträchtigung nicht nur der Lokalisation von EP1:GFP, sondern der gesamten Zellmorphologie. Vermutlich handelt es sich hierbei allerdings nicht um spezifische Effekte auf die GPI-verankerten Proteine, sondern um einen grundlegenden Effekt auf die gesamte Zellarchitektur aufgrund des Ceramidmangels, welcher auch die Lokalisation von GPI-verankerten Proteinen beeinträchtigt. Eine Abgrenzung des spezifischen Effektes auf die GPI-verankerten Proteine ist nur schwer möglich.

Die RNA-Interferenz lieferte auch keine Hinweise auf die genaue Lokalisation der sauren Sphingomyelinase. Für die Lokalisation der sauren Sphingomyelinase in späten Endosomen oder im Lysosom spricht nicht nur, dass das orthologe Protein in Säugerzellen im Lysosom lokalisiert, sondern auch, dass das Edukt der durch die Sphingomyelinase katalysierten Reaktion durch Endozytose aufgenommen wird. Die Trennung endozytierter Liganden von ihren Rezeptoren findet in *T. brucei* vor allem in *recycling* Endosomen statt (M. Engstler, unveröffentlicht). Anschließend werden die lumenalen Proteine in die späten Endosomen und letztendlich zum Lysosom transportiert. Bei den von dem *knock down* betroffenen Zellen gibt es allerdings nicht nur eine Störung des Lysosoms, sondern eine Auflösung der gesamten Zellstruktur. Während das Zytoskelett stark beeinträchtigt ist und die Zellen eine unregelmäßige Form annehmen, scheinen auch die inneren Kompartimente betroffen zu sein, da EP1:GFP sehr diffus über den posterioren Teil der Zelle verteilt wird. Zudem sind in der Nomarski-Optik intrazelluläre, abgerundete Strukturen erkennbar, welche die für Liposomen charakteristische Lichtbrechung aufweisen. Eine solche Ansammlung von überschüssigen Phospholipiden wäre ein deutlicher Hinweis auf eine Störung bezüglich des Membranaufbaus und seiner Regulation.

Diese grundlegende Beeinträchtigung der zellulären Architektur hängt vermutlich mit der metabolischen Funktion der sauren Sphingomyelinase zusammen. Anhand von Dextran wurde gemessen, dass *T. brucei* 90% des endozytierten Materials sofort wieder über die frühen und *recycling* Endosomen exozytiert (Engstler *et al.*, 2004). Demnach ist ein Rückstau an LDL-Partikeln als solcher nur dann möglich, wenn dieses Recycling die späten Endosomen umgeht und der Transport zu den späten Endosomen bzw. zum Lysosom irreversibel ist. In diesem Transportweg könnte dann ein Rückstau der LDL-Partikel stattfinden. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass VSG aus den späten Endosomen zu den frühen oder *recycling* Endosomen transportiert wird (Engstler *et al.*, 2004). Ein solcher Rückstau in signifikantem Ausmaß ist deshalb nicht anzunehmen.

Der *knock down* zeigt also vermutlich primär die Folgen von der Ansammlung von Sphingomyelin nach Spaltung der LDL-Partikel und dem Mangel an Ceramiden. Beide Optionen lassen sich bei der gegenwärtigen Datenlage nur schwer nachweisen bzw. ausschließen.

Es ist für Säugerzellen postuliert worden, dass die Ansammlung von Sphingomyelin in späten Endosomen und Lysosom entscheidend den Transport zum Golgi und die Organisation

des Transports durch Ausbildung von *lipid rafts* stört (Harder und Simons 1997; Sillence 2001). Sphingolipide und somit auch Ceramide haben außerdem einen großen Anteil an einer Vielzahl von Signaltransduktionen und Apoptose-Regulation (Kitatani *et al.*, 2008). Die direkten Auswirkungen des Mangels an Ceramiden auf die Membranstrukturen ist allerdings bislang kaum untersucht worden. Allerdings können Säugerzellen Ceramide *de novo* herstellen (Pewzner-Jung *et al.*, 2006) und weisen deshalb auch bei Ausschaltung der sauren Sphingomyelinase nicht den Mangel an Ceramiden auf, welcher in *T. brucei* auftritt.

Der *knock down* der sauren Sphingomyelinase in *T. brucei* führt anscheinend zu der Akkumulation von Membranmaterial sowohl als Liposomen im Zellinnern wie in der Plasmamembran, wo die Zuführung von Membranmaterial zur Ausbildung der amöboiden Zellform führen kann. Dies ist ein Hinweis auf sogenannte *blebs*, welche in anderen eukaryotischen Zellen durch die Erhöhung des Ceramidanteils in den Membranen auftreten (Iturralde *et al.*, 2003). Eine Vielzahl unterschiedlichster Signale führt zu der Ausbildung dieser *blebs*. Eine genauere Analyse der Wechselwirkung zwischen Ceramidmangel und dem Zytoskelett und der Plasmamembran von *T. brucei* sowie eine genauere ultrastrukturelle Untersuchung der Zellen nach *knock down* der Sphingomyelinase können letztlich darüber Auskunft geben, ob diese Beobachtungen wirklich auf eine ähnliche Funktion von Ceramiden zurückzuführen sind.

Auf Grundlage meiner Ergebnisse ergibt sich das folgende Modell für das Trafficking von GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei*:

Nach der Synthese des Proteins, der N-Glycosylierung und der Übertragung des GPI-Ankers auf das Protein werden die GPI-verankerten Proteine in COP I-Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat transportiert. Die Sortierungsmechanismen im ER sind ungeklärt. Das Lektin *Tb*ERGIC spielt hierbei keine Rolle. Der genaue Weg der GPI-verankerten Proteine zur Plasmamembran ist ungeklärt und es konnte bislang kein Protein ermittelt werden, dass diesen Transport reguliert. *Tb*Rab11 ist zwar vermutlich an Transport beteiligt, scheint aber nicht essentiell für den Transport von neusynthetisierten GPI-verankerten Proteinen zur Flagellartasche.

Die gesamte Endozytose in *T. brucei* hängt von Clathrin ab. Die weitere Differenzierung des Transportweges, insbesondere in den frühen Endosomen, benötigt noch weitere Untersuchungen. *Tb*Rab5B ist zwar ein Marker für die frühen endosomalen Kompartimente, spielt aber offenbar eine größere Rolle bei der Balancierung des Membrantraffickings. Der beobachtete Phänotyp weist vielmehr auf eine ganz andere, wenn auch grundlegende Funktion hin. An dem Transport von EP1:GFP beteiligt sind wiederum die spätendosomalen Proteine *Tb*Rab7 und *Tb*VPS1, welche beide bei dem Transport der GPI-verankerten Proteine

zum Lysosom eine Rolle spielen. An dem Recycling hingegen sind das Retromer sowie der TRAPP-Komplex beteiligt.

Die Fortführung der Entwicklung des Assays durch RNAi sollte die Durchführung der RNA-Interferenz in der pleomorphen Zelllinie beinhalten, die Zusammenhänge im *short stumpy*-Lebensstadium zu untersuchen. Als zusätzliches Markerprotein wird vorzugsweise ein transmembranverankertes Protein benötigt. Die Klonierung einer transmembranverankerten EP1:YFP-Mutante führte allerdings nur zu einem sehr niedrigen Expressionsniveau, so dass hier unter Umständen mit Schwierigkeiten zu rechnen ist. Gerade die große Menge an GPI-verankerten Proteinen in *T. brucei* könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass die Zellen eine entsprechende Menge an transmembranverankerten Proteinen nicht regulär sortieren können und so leicht bei einer Überexpression eine unphysiologische Lokalisation des Proteins auftreten kann. Durch eine solche Lokalisation wäre ein Reporterprotein nur begrenzt geeignet, die Transportwege und -mechanismen aufzuklären.

Die Reduktion des Klonierungsaufwandes lässt sich dank mittlerweile effizienterer Elektroporationsgeräte und Morpholino-Oligos leicht erreichen, dies bedeutet aber unter Umständen eine höhere Schwierigkeit bei der Analyse der Zellen, da die Elektroporationseffizienz nach wie vor nicht 100% erreicht.

Die Durchführung der RNA-Interferenz in *short stumpy*-Trypanosomen ist ebenfalls komplex. Gerade die schwierige Kultivierbarkeit dieses Lebensstadiums sowie das gleichzeitige Vorliegen von *long slender* mit *short stumpy* Zellen bei einer Infektion setzen einen sehr engen Zeitrahmen für die Analyse der Zellen. Die gleichzeitige quantitative Beobachtung von charakteristischen Markerproteinen für das *short stumpy*-Lebensstadium ist hierbei notwendig.

Der zweite, grundsätzliche Ansatz, der aus dieser Arbeit folgt, wäre die detailliertere Analyse der gefundenen Steuerungsproteine des Transportweges von GPI-verankerten Proteinen. Hierbei wäre zunächst ein Screening nach den Interaktionsproteinen von COP I zu nennen, welches Licht in die molekularen Mechanismen der Sortierung von GPI-verankerten Proteinen bringen könnte.

Ebenfalls wäre zu untersuchen, ob das weitere L-Lektin, welches durch die BLAST-Suche gefunden wurde (Tb10.20.0130), ein Ortholog des ER-Lektins VIPL ist und bei der Sortierung von N-glycosylierten GPI-verankerten Proteinen eine Rolle spielt. In diesem Kontext ist die unbekannte Membranverankerung der Lektine eine wichtige Frage: laut SMART-Analyse weisen beide L-Lektine in *T. brucei* keine Transmembrandomäne auf. Liegt hier eine bislang nicht erkennbare Transmembrandomäne mit ungewöhnlicher AS-Sequenz vor oder werden die Lektine durch Adaptorproteine an die Membran gebunden?



Mithilfe von ultrastrukturellen Untersuchungen der *recycling* Endosomen wäre es möglich, nähere Hinweise auf die Transportmechanismen zwischen *trans*-Golgi-Apparat und der Plasmamembran zu bekommen. Gerade die Sortierungsmaschinerie, die zu einer Aufkonzentrierung des VSG führt, wäre hier ein interessanter Ansatzpunkt. Allerdings könnte dieses Projekt nur mit einem einfach detektierbaren VSG durchgeführt werden. Das fluoreszierende VSG'Y' bietet sich hierbei leider nicht an, da die intrazelluläre Lokalisation nicht sichtbar ist und man somit wie bei anderen VSGs allein auf Immunfluoreszenzen angewiesen ist.

Die Ergebnisse der RNA-Interferenz von *TbSTT3* geben Anlass zu einem Vergleich zwischen *long slender* und *short stumpy*-Zellen bezüglich der Proteine an der Einmündung des Flagellums in die Flagellartasche. Die molekularen Mechanismen, die bei Ablation von *TbSTT3* dazu führt, dass eine gewisse Menge an EP1:GFP auf die pellikulare Zellmembran gelangt, sind vermutlich spezifisch für *long slender* Trypanosomen und insofern auf als Ansatzpunkte für Therapeutika interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei an dem Transport in späten Endosomen beteiligte Proteine identifiziert werden (*TbRab7* und *TbVPS11*). Neben der genaueren biochemischen Analyse des HOPS-Komplexes und der möglichen Interaktion beider Proteine steht die Analyse der Membranstrukturen vor einem Problem. Die bei *TbRab7* beobachtete, schwerfixierbare Struktur könnte durch moderne *high pressure-freezing* Methoden konservierbar sein und so eine ultrastrukturelle Analyse erlauben. Dies könnte auch die nähere Charakterisierung der späten Endosomen erlauben, insbesondere die Differenzierung zwischen dem Teil der späten Endosomen, der für VSG/EP1:GFP zugänglich ist und dem Teil, der es nicht ist.

Letztlich offen sind die Fragen, in wieweit ohne *TbVPS29* die Transportvesikel des Retromers gebildet werden und wie die GPI-verankerten Proteinen zum *trans*-Golgi-Apparat recycelt werden. Die mögliche Beteiligung des TRAPP-Komplexes sowie die ungeklärte Funktion von *TbVPS29* bei der Fusion der Retromervesikel bieten ein weites Feld für nähere Analysen. Gerade die Trennung von VSG und EP1:GFP bei RNAi gegen *TbVPS29* weist auf weitere Sortierungsmechanismen hin. Die molekulare Grundlage dieser Sortierung und ob sie mit der Konzentrierung des VSGs bei Transport zur Plasmamembran zusammenhängt, könnte die weitergehenden Arbeiten in diesem Kontext hoch interessant machen.

Die Ergebnisse des RNA-Interferenz-Assays und Auswertung durch die Nutzung fluoreszierender Reporterproteine bestätigt trotz der offenen Fragen jedoch die gemeinsamen Eckpunkte des intrazellulären Transportweges von *T. brucei* und Säugerzellen. Die Phänotypen der hier untersuchten Zellen nach RNA-Interferenz bewiesen zumeist eine Beteiligung der jeweiligen Proteine demselben Punkt des endosomalen Transportweges und stecken so einen Rahmen, um die Beteiligung weiterer Proteine bestimmen zu können. Die Fälle, in denen eine abweichende Lokalisation des GPI-verankerten Reporterproteins festgestellt wurde, weisen auf eine grundlegende Funktion der Proteine hin, die auch in

Säugerzellen so vorliegen kann. Das Vorliegen von mehreren Transportwegen zwischen späten Endosomen und dem *trans*-Golgi-Apparat in Säugerzellen verhindert möglicherweise den Nachweis, dass das Retromer an dieser Stelle des Endomembrantransportes auch in Säugerzellen beteiligt ist, während in *T. brucei* keine alternativen Transportwege existieren und so der Einfluss von TbVPS29 auf den Transport zum *trans*-Golgi-Apparat sichtbar wird. Deutlich wird der Vorteil von *T. brucei* an anderer Stelle: das Fehlen von Caveolin führt bei knock down von Clathrin zu einem eindeutigen Phänotyp und erleichtert so maßgeblich die Analyse.

Trotzdem stehen zwei entscheidende Schritte bei der Etablierung des Assays noch aus. Die strikte Zellarchitektur von *T. brucei* ermöglichte eine Auswertung der Phänotypen allein anhand der Colokalisationen zu Positionen des Reporterproteins zu den beteiligten Organellen. Für die Anwendung des Assays mit hohen Durchsatzraten ist eine mathematische Messung der Lokalisationen und ihrer Änderungen notwendig. Neben der Intensität von Fluoreszenzsignalen spielen hier vor allem die Abstände zu den verschiedenen Zellorganellen eine entscheidende Rolle. Die feste Position sowie das Vorhandensein von nur einem Organell in der Zelle werden hier die Erhebung statistischer Daten vereinfachen. Hierbei spielt allerdings aufgrund der Teilung der Organellen während des Zellzyklus die Bestimmung der Zellzyklusposition der Zelle eine wesentliche Rolle. Ein erster Schritt in diese Richtung ist durch die Beschreibung der Zellorganellen während des Zellzyklus in BSF gemacht worden (J. Jung, Diplomarbeit).

Eine Arbeit mit ähnlicher Zielsetzung ist vor kurzem in Säugerzellen durchgeführt worden und beweist deutlich die Vorteile des Assays in *T. brucei*. Zur Bestimmung der Position von Endosomen in HeLa-Zellen wurde vor allem der Abstand zum Nukleus als Referenz verwendet (Collinet *et al.*, 2010). In *T. brucei* hingegen können auch die Abstände zu anderen Organellen wie dem Golgi-Apparat, dem ERGIC und dem Lysosom sowie die Orientierung anhand der Zellachse hinzugezogen werden. Dies ermöglicht eine Beschreibung des gesamten endosomalen und biosynthetischen Transportweges von Proteinen.

Der technische Fortschritt ermöglicht durch automatisierte Mikroskopaufnahmen, sehr viel höhere Transfektionseffizienzen und Analysemethoden wie real time PCR eine Datenerhebung, welche eine breite statistische Grundlage für die Fortentwicklung des Assays ermöglicht. In diesem Sinne ist die Durchführung dieses Assays, welches hier im kleinen Rahmen etabliert wurde, jetzt mit Is BSF und prozyklischen Trypanosomen desselben Stammes möglich. Die Durchführung des Assays in ss BSF Trypanosomen ist zur Zeit aufgrund der schwierigen Kultivierbarkeit dieser Zellen und der damit verbundenen notwendigen Tiernutzung in diesen Maßstäben noch schwierig, so dass hier auf die Etablierung alternativer in vitro Kultivierungsmethoden für ss BSF Trypanosomen zu hoffen ist.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrami L, Fivaz M, Kobayashi T, Kinoshita T, Parton RG und van der Goot FG (2001). "Cross-talk between caveolae and glycosylphosphatidylinositol-rich domains." *J Biol Chem* **276**(33): 30729-30736.
- Ackers JP, Dhir V und Field MC (2005). "A bioinformatic analysis of the RAB genes of *Trypanosoma brucei*." *Molecular & Biochemical Parasitology*.
- Acosta-Serrano A, Cole RN, Mehlert A, Lee MG, Ferguson MA und Englund PT (1999). "The procyclin repertoire of *Trypanosoma brucei*. Identification and structural characterization of the Glu-Pro-rich polypeptides." *J Biol Chem* **274**(42): 29763-29771.
- Acosta-Serrano A, Vassella E, Liniger M, Kunz Renggli C, Brun R, Roditi I und Englund PT (2001). "The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(4): 1513-1518.
- Alarcon CM, Son HJ, Hall T und Donelson JE (1994). "A monocistronic transcript for a trypanosome variant surface glycoprotein." *Molecular and Cellular Biology* **14**(8): 5579-5591.
- Alexander DL, Schwartz KJ, Balber AE und Bangs JD (2002). "Developmentally regulated trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **115**(Pt 16): 3253-3263.
- Allen CL, Goulding D und Field MC (2003). "Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*." *EMBO J* **22**(19): 4991-5002.
- Añez N (1982). "Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV--A reconsideration of its systematic position." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **77**(4): 405-415.
- Antoine-Moussiaux N, Büscher P und Desmecht D (2009). "Host-parasite interactions in trypanosomiasis: on the way to an antidisease strategy." *Infect Immun* **77**(4): 1276-1284.
- Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F und Hauri HP (1999). "The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins." *Nat Cell Biol* **1**(6): 330-334.
- Arighi C (2004). "Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." *The Journal of Cell Biology* **165**(1): 123-133.
- Atrih A, Richardson JM, Prescott AR und Ferguson MA (2005). "*Trypanosoma brucei* glycoproteins contain novel giant poly-N-acetyllactosamine carbohydrate chains." *J Biol Chem* **280**(2): 865-871.
- Bakhiet M, Olsson T, Edlund C, Höjeberg B, Holmberg K, Lorentzen J und Kristensson K (1993). "A *Trypanosoma brucei* brucei-derived factor that triggers CD8+ lymphocytes to interferon-gamma secretion: purification, characterization and protective effects in vivo by treatment with a monoclonal antibody against the factor." *Scand J Immunol* **37**(2): 165-178.
- Balasegaram M, Harris S, Checchi F, Ghorashian S, Hamel C und Karunakara U (2006). "Melarsoprol versus eflornithine for treating late-stage Gambian trypanosomiasis in the Republic of the Congo." *Bull World Health Organ* **84**(10): 783-791.

- Banerjee S, Vishwanath P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW und Samuelson J (2007). "The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation." *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(28): 11676-11681.
- Bangs JD, Brouch EM, Ransom DM und Roggy JL (1996). "A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting." *J Biol Chem* **271**(31): 18387-18393.
- Bangs JD, Uyetake L, Brickman MJ, Balber AE und Boothroyd JC (1993). "Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote." *J Cell Sci* **105 ( Pt 4)**: 1101-1113.
- Banta LM, Robinson JS, Klionsky DJ und Emr SD (1988). "Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting." *J Cell Biol* **107**(4): 1369-1383.
- Barry JD und Emergy DL (1984). "Parasite development and host responses during the establishment of *Trypanosoma brucei* infection transmitted by tsetse fly." *Parasitology* **88 ( Pt 1)**: 67-84.
- Barry JD, Graham SV, Fotheringham M, Graham VS, Kobryn K und Wymer B (1998). "VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 93-105.
- Barry JD und McCulloch R (2001). "Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite." *Adv Parasitol* **49**: 1-70.
- Bastin P, Sherwin T und Gull K (1998). "Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility." *Nature* **391**(6667): 548.
- Belden WJ und Barlowe C (1996). "Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required ...." *Journal of Biological Chemistry*.
- Ben-Tekaya H, Miura K, Pepperkok R und Hauri HP (2005). "Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 357-367.
- Benting JH, Rietveld AG und Simons K (1999). "N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells." *J Cell Biol* **146**(2): 313-320.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C und Blandin G (2005). "The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science*.
- Bishop A (1967). "Problems in the cultivation of some parasitic protozoa." *Adv Parasitol* **5**: 93-138.
- Blum ML, Down JA, Gurnett AM, Carrington M, Turner MJ und Wiley DC (1993). "A structural motif in the variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*." *Nature* **362**(6421): 603-609.
- Böhme U und Cross GA (2002). "Mutational analysis of the variant surface glycoprotein GPI-anchor signal sequence in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **115**(Pt 4): 805-816.
- Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N und Robinson DR (2008). "Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated." *PLoS Biol* **6**(5): e105.

- Bonifacino JS und Glick BS (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." *Cell* **116**(2): 153-166.
- Bonifacino JS und Traub LM (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." *Annu Rev Biochem* **72**: 395-447.
- Boothroyd JC und Cross GA (1982). "Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end." *Gene* **20**(2): 281-289.
- Brems S, Guilbride DL, Gundlesdodjir-Planck D, Busold C, Luu VD, Schanne M, Hoheisel J und Clayton C (2005). "The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes." *Molecular and biochemical parasitology* **139**(2): 163-172.
- Brickman MJ und Balber AE (1994). "Transport of a lysosomal membrane glycoprotein from the Golgi to endosomes and lysosomes via the cell surface in African trypanosomes." *J Cell Sci* **107 ( Pt 11)**: 3191-3200.
- Bringaud F, Peyruchaud S, Baltz D, Giroud C, Simpson L und Baltz T (1995). "Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **74**(1): 119-123.
- Brown DA, Crise B und Rose JK (1989). "Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells." *Science* **245**(4925): 1499-1501.
- Bruhn H (2005). "A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins." *Biochem. J.*
- Brun R und Jenni L (1985). "Cultivation of African and South American trypanosomes of medical or veterinary importance." *Br Med Bull* **41**(2): 122-129.
- Bülow R, Nonnengässer C und Overath P (1989). "Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic forms of *Trypanosoma brucei*." *Molecular and biochemical parasitology* **32**(1): 85-92.
- Cai H, Yu S, Menon S, Cai Y, Lazarova D, Fu C, Reinisch K, Hay JC und Ferro-Novick S (2007). "TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23." *Nature* **445**(7130): 941-944.
- Cai H, Zhang Y, Pypaert M, Walker L und Ferro-Novick S (2005). "Mutants in *trs120* disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi." *J Cell Biol* **171**(5): 823-833.
- Caramelo JJ und Parodi AJ (2008). "Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles." *J Biol Chem* **283**(16): 10221-10225.
- Cardoso De Almeida ML, Geuskens M und Pays E (1999). "Cell lysis induces redistribution of the GPI-anchored variant surface glycoprotein on both faces of the plasma membrane of *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **112 ( Pt 23)**: 4461-4473.
- Caron E, Cote C, Parisien M, Major F und Perreault C (2006). "Identification of two distinct intracellular localization signals in STT3-B." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **445**(1): 108-114.
- Carrington M und Boothroyd J (1996). "Implications of conserved structural motifs in disparate trypanosome surface proteins." *Mol Biochem Parasitol* **81**(2): 119-126.



- Carrington M, Miller N, Blum M, Roditi I, Wiley D und Turner M (1991). "Variant specific glycoprotein of *Trypanosoma brucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues." *J Mol Biol* **221**(3): 823-835.
- Casanova JE (2007). "Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors." *Traffic* **8**(11): 1476-1485.
- Catino MA, Paladino S, Tivodar S, Pocard T und Zurzolo C (2008). "N- and O-glycans are not directly involved in the oligomerization and apical sorting of GPI proteins." *Traffic* **9**(12): 2141-2150.
- Cazzulo JJ, Hellman U, Couso R und Parodi AJ (1990). "Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues." *Molecular and biochemical parasitology* **38**(1): 41-48.
- Chappuis F, Udayraj N, Stietenroth K, Meussen A und Bovier PA (2005). "Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei* gambiense human African trypanosomiasis." *Clin Infect Dis* **41**(5): 748-751.
- Chattopadhyay A, Jones NG, Nietlispach D, Nielsen PR, Voorheis HP, Mott HR und Carrington M (2005). "Structure of the C-terminal domain from *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein MITat1.2." *J Biol Chem* **280**(8): 7228-7235.
- Chavan M und Lennarz W (2006). "The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation." *Trends Biochem Sci* **31**(1): 17-20.
- Checchi F, Filipe JAN und Haydon DT (2008). "Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness." *BMC Infectious Diseases*.
- Chen W, Feng Y, Chen D und Wandinger-Ness A (1998). "Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor." *Mol Biol Cell* **9**(11): 3241-3257.
- Claes F, BuĐscher P, Touratier L und Goddeeris BM (2005). "*Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake?" *Trends in Parasitology*.
- Clayton C und Shapira M (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." *Molecular and biochemical parasitology* **156**(2): 93-101.
- Collinet C, Stöter M, Bradshaw CR, Samusik N, Rink JC, Kenski D, Habermann B, Buchholz F, Henschel R, Mueller MS, Nagel WE, Fava E, Kalaidzidis Y, und Zerial M (2010). "Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis." *Nature* **464**(7286): 243-9.
- Collins BM, Skinner C, Watson P, Seaman M und Owen DJ (2005a). "Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly." *Nat Struct Mol Biol* **12**(7): 594-602.
- Collins KM, Thorngren NL, Fratti RA und Wickner WT (2005b). "Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion." *EMBO J* **24**(10): 1775-1786.
- Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R und Parodi AJ (2003). "The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum." *Molecular Biology of the Cell* **14**(9): 3529-3540.



- Cooper AA und Stevens TH (1996). "Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases." *J Cell Biol* **133**(3): 529-541.
- Coppens I, Levade T und Courtoy PJ (1995). "Host plasma low density lipoprotein particles as an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **270**(11): 5736-5741.
- Costaguta G, Stefan CJ, Bensen ES, Emr SD und Payne GS (2001). "Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport." *Mol Biol Cell* **12**(6): 1885-1896.
- Coustou V, Besteiro S, Biran M, Diolez P, Bouchaud V, Voisin P, Michels PA, Canioni P, Baltz T und Bringaud F (2003). "ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation." *J Biol Chem* **278**(49): 49625-49635.
- Cox R, Chen SH, Yoo E und Segev N (2007). "Conservation of the TRAPP-II-specific subunits of a Ypt/Rab exchanger complex." *BMC Evol Biol* **7**: 12.
- Cross GA (1977). "Isolation, structure and function of variant-specific surface antigens." *Annales de la Société belge de médecine tropicale* **57**(4-5): 389-402.
- Cross GA (1990). "Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes." *Annu Rev Immunol* **8**: 83-110.
- Damen E, Krieger E, Nielsen J, Eygensteyn J und Van Leeuwen J (2006). "The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide." *Biochem. J.* **398**(3): 399.
- Dawe HR, Farr H und Gull K (2007). "Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells." *J Cell Sci* **120**(Pt 1): 7-15.
- de la Canal L und Parodi AJ (1987). "Synthesis of dolichol derivatives in trypanosomatids. Characterization of enzymatic patterns." *J Biol Chem* **262**(23): 11128-11133.
- de Raadt P (2005). "The history of sleeping sickness." *Fourth International Cours on African Trypanosomes*(Tunis, 11-28 October).
- Dean S, Marchetti R, Kirk K und Matthews KR (2009). "A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal." *Nature* **459**(7244): 213-217.
- Dell'Angelica EC und Payne GS (2001). "Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales." *Cell* **106**(4): 395-398.
- Deocaris CC, Kaul SC und Wadhwa R (2006). "On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60." *Cell Stress & Chaperones*.
- Donelson JE (2003). "Antigenic variation and the African trypanosome genome." *Acta Trop* **85**(3): 391-404.
- Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouède S, Boucher JL, Wilson KT, Veyret B und Gobert AP (2004). "Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect." *J Immunol* **172**(10): 6298-6303.
- Elortza F, Mohammed S, Bunkenborg J, Foster LJ, Nühse TS, Brodbeck U, Peck SC und Jensen ON (2006). "Modification-specific proteomics of plasma membrane proteins: identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins released upon phospholipase D treatment." *J Proteome Res* **5**(4): 935-943.

- Engstler M, Bangs J und Field MC (2007a). "Intracellular transport systems in trypanosomes: function, evolution and virulence." in „*Trypanosomes – After the Genome*“(J. D. Barry et al (ed.) Horizon Press): 86.
- Engstler M und Boshart M (2004). "Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*." *Genes Dev* **18**(22): 2798-2811.
- Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S, Boshart M, Wiegertjes G, Heddergott N und Overath P (2007b). "Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes." *Cell* **131**(3): 505-515.
- Engstler M, Reuter G und Schauer R (1993). "The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein." *Mol Biochem Parasitol* **61**(1): 1-13.
- Engstler M, Thilo L, Weise F, Grünfelder CG, Schwarz H, Boshart M und Overath P (2004). "Kinetics of endocytosis and *recycling* of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1105-1115.
- Engstler M, Weise F, Bopp K und Grünfelder CG (2005a). "The membrane-bound histidine acid phosphatase Tb MBAP1 is essential for endocytosis and membrane ...." *Journal of Cell Science*.
- Engstler M, Weise F, Bopp K, Grünfelder CG, Günzel M, Heddergott N und Overath P (2005b). "The membrane-bound histidine acid phosphatase TbMBAP1 is essential for endocytosis and membrane *recycling* in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Sci* **118**(Pt 10): 2105-2118.
- Eskelinen EL (2005). "Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells." *Autophagy* **1**(1): 1-10.
- Esser KM, Schoenbecher MJ und Gingrich JB (1982). "*Trypanosoma rhodesiense* blood forms express all antigen specificities relevant to protection against metacyclic (insect form) challenge." *J Immunol* **129**(4): 1715-1718.
- Faúndez V, Horng JT und Kelly RB (1998). "A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes." *Cell*.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA und Rademacher TW (1988). "Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane." *Science* **239**(4841 Pt 1): 753-759.
- Ferguson MA, Low MG und Cross GA (1985). "Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein." *J Biol Chem* **260**(27): 14547-14555.
- Field H, Sherwin T, Smith AC, Gull K und Field MC (2000). "Cell-cycle and developmental regulation of TbRAB31 localisation, a GTP-locked Rab protein from *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **106**(1): 21-35.
- Field MC und Carrington M (2004). "Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*." *Traffic* **5**(12): 905-913.
- Field MC, Menon AK und Cross GA (1991). "A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*: lipid structure and biosynthesis." *The EMBO Journal* **10**(10): 2731-2739.

- Field MC und O'Reilly AJ (2008). "How complex is GTPase signaling in trypanosomes?" *Trends Parasitol* **24**(6): 253-257.
- Figueiredo LM und Cross GA (2010). "Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes." *Eukaryotic Cell* **9**(1): 148-154.
- Figueiredo LM, Janzen CJ und Cross GA (2008). "A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes." *PLoS Biol* **6**(7): e161.
- Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG und van der Goot FG (2002). "Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins." *EMBO J* **21**(15): 3989-4000.
- Fraldi A, Zito E, Annunziata F, Lombardi A, Cozzolino M, Monti M, Spampanato C, Ballabio A, Pucci P, Sitia R und Cosma MP (2008). "Multistep, sequential control of the trafficking and function of the multiple sulfatase deficiency gene product, SUMF1 by PDI, ERGIC-53 and ERp44." *Hum Mol Genet* **17**(17): 2610-2621.
- Freyman D, Down J, Carrington M, Roditi I, Turner M und Wiley D (1990). "2.9 Å resolution structure of the N-terminal domain of a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*." *J Mol Biol* **216**(1): 141-160.
- Furuya T, Kessler P, Jardim A, Schnauffer A, Crudder C und Parsons M (2002). "Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(22): 14177-14182.
- Furuya T, Okura M, Ruiz FA, Scott DA und Docampo R (2001). "TcSCA complements yeast mutants defective in Ca<sup>2+</sup> pumps and encodes a Ca<sup>2+</sup>-ATPase that localizes to the endoplasmic reticulum of *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* **276**(35): 32437-32445.
- Futerman AH, Low MG, Ackermann KE, Sherman WR und Silman I (1985). "Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane-anchoring domain of Torpedo acetylcholinesterase." *Biochem Biophys Res Commun* **129**(1): 312-317.
- García-Salcedo JA, Pérez-Morga D, Gijón P, Dilbeck V, Pays E und Nolan DP (2004). "A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*." *The EMBO Journal* **23**(4): 780-789.
- Geerts S, Holmes PH, Eisler MC und Diall O (2001). "African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance." *Trends Parasitol* **17**(1): 25-28.
- Gibson W (2003). "Species concepts for trypanosomes: from morphological to molecular definitions?" *Kinetoplastid Biol Dis* **2**(1): 10.
- Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K und Bailey M (2008). "The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*." *Parasit Vectors* **1**(1): 4.
- Gibson WC, Stevens JR, Mwendia CM, Ngotho JN und Ndung'u JM (2001). "Unravelling the phylogenetic relationships of African trypanosomes of suids." *Parasitology* **122**(Pt 6): 625-631.
- Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME und Donelson JE (2007). "A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes." *PLoS Pathog* **3**(10): 1432-1445.
- Grisard EC (2002). "Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma." *Kinetoplastid Biol Dis* **1**(1): 5.

- Gruenberg J und Stenmark H (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 317-323.
- Grünfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, Boshart M und Overath P (2002). "Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels." *Traffic* **3**(8): 547-559.
- Grünfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, Morgan GW, Field MC und Overath P (2003). "Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers." *Mol Biol Cell* **14**(5): 2029-2040.
- Gull K (2003). "Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies." *Curr Opin Microbiol* **6**(4): 365-370.
- Günzl A, Bruderer T, Laufer G, Schimanski B, Tu LC, Chung HM, Lee PT und Lee MG (2003). "RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*." *Eukaryotic Cell* **2**(3): 542-551.
- Güther ML und Ferguson MA (1995). "The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*." *The EMBO Journal* **14**(13): 3080-3093.
- Güther ML, Leal S, Morrice NA, Cross GA und Ferguson MA (2001). "Purification, cloning and characterization of a GPI inositol deacylase from *Trypanosoma brucei*." *The EMBO Journal* **20**(17): 4923-4934.
- Güther ML, Lee S, Tetley L, Acosta-Serrano A und Ferguson MA (2006). "GPI-anchored proteins and free GPI glycolipids of procyclic form *Trypanosoma brucei* are nonessential for growth, are required for colonization of the tsetse fly, and are not the only components of the surface coat." *Mol Biol Cell* **17**(12): 5265-5274.
- Güther ML, Masterson WJ und Ferguson MA (1994). "The effects of phenylmethylsulfonyl fluoride on inositol-acylation and fatty acid remodeling in African trypanosomes." *J Biol Chem* **269**(28): 18694-18701.
- Haanstra JR, Stewart M, Luu VD, van Tuijl A, Westerhoff HV, Clayton C und Bakker BM (2008). "Control and regulation of gene expression: quantitative analysis of the expression of phosphoglycerate kinase in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **283**(5): 2495-2507.
- Haanstra JR, van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PA, Westerhoff HV, Parsons M und Bakker BM (2008). "Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(46): 17718-17723.
- Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, Siqueira H, Torri AF, Tytler EM und Esko JD (1989). "Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein." *J Biol Chem* **264**(9): 5210-5217.
- Hall B, Allen CL, Goulding D und Field MC (2004). "Both of the Rab5 subfamily small GTPases of *Trypanosoma brucei* are essential and required for endocytosis." *Mol Biochem Parasitol* **138**(1): 67-77.
- Hanahan D, Jessee J und Bloom FR (1991). "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Meth Enzymol* **204**: 63-113.

- Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR und Michels PA (2003). "Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida." *Kinetoplastid Biol Dis* **2**(1): 11.
- Hao M und Maxfield FR (2000). "Characterization of rapid membrane internalization and recycling." *J Biol Chem* **275**(20): 15279-15286.
- Hara-Kuge S, Ohkura T, Ideo H, Shimada O, Atsumi S und Yamashita K (2002). "Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells." *J Biol Chem* **277**(18): 16332-16339.
- Harder T und Simons K (1997). "Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains." *Curr Opin Cell Biol* **9**(4): 534-542.
- Hartl FU, Martin J und Neupert W (1992). "Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **21**: 293-322.
- Hastings KE (2005). "SL trans-splicing: easy come or easy go?" *Trends Genet* **21**(4): 240-247.
- Hauri HP, Kappeler F, Andersson H und Appenzeller C (2000). "ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway." *J Cell Sci* **113** ( Pt 4): 587-596.
- He CY, Ho HH, Malsam J, Chalouni C, West CM, Ullu E, Toomre D und Warren G (2004). "Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*." *J Cell Biol* **165**(3): 313-321.
- Helfert S, Estévez AM, Bakker B, Michels PA und Clayton C (2001). "Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*." *Biochem J* **357**(Pt 1): 117-125.
- Helm JR, Wilson ME und Donelson JE (2008). "Different trans RNA splicing events in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*." *Molecular and biochemical parasitology* **159**(2): 134-137.
- Herman M, Gillies S, Michels PA und Rigden DJ (2006). "Autophagy and Related Processes in Trypanosomatids: Insights from Genomic and Bioinformatic Analyses ...." *Autophagy*.
- Hese K, Otto C, Routier F und Lehle L (2008). "The yeast oligosaccharyltransferase complex can be replaced by STT3 from *Leishmania major*." *Glycobiology* **19**(2): 160-171.
- Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS und Hurley JH (2007). "Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex." *Nature* **449**(7165): 1063-1067.
- Hoare CR (1972). "The trypanosomes of the Mammals." *Blackwell, Oxford*.
- Hobbs MR und Boothroyd JC (1990). "An expression-site-associated gene family of trypanosomes is expressed in vivo and shows homology to a variant surface glycoprotein gene." *Molecular and biochemical parasitology* **43**(1): 1-16.
- Holzmüller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Gonçalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P und Jamonneau V (2008). "Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics." *Microbes Infect* **10**(1): 79-86.



- Hong Y, Nagamune K, Morita YS, Nakatani F, Ashida H, Maeda Y und Kinoshita T (2006). "Removal or maintenance of inositol-linked acyl chain in glycosylphosphatidylinositol is critical in trypanosome life cycle." *J Biol Chem* **281**(17): 11595-11602.
- Huete-Pérez JA, Engel JC, Brinen LS, Mottram JC und McKerrow JH (1999). "Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif." *J Biol Chem* **274**(23): 16249-16256.
- Hughes K, Wand M, Foulston L, Young R, Harley K, Terry S, Ersfeld K und Rudenko G (2007). "A novel ISWI is involved in VSG expression site downregulation in African trypanosomes." *The EMBO Journal* **26**(9): 2400-2410.
- Igura M, Maita N, Kamishikiryo J, Yamada M, Obita T, Maenaka K und Kohda D (2008). "Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase." *EMBO J* **27**(1): 234-243.
- Ikeda M, Arai M, Lao DM und Shimizu T (2002). "Transmembrane topology prediction methods: a re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies." *In Silico Biol (Gedruckt)* **2**(1): 19-33.
- Itin C, Roche AC, Monsigny M und Hauri HP (1996). "ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins." *Mol Biol Cell* **7**(3): 483-493.
- Iturralde M, Gamen S, Pardo J, Bosque A, Piñeiro A, Alava MA, Naval J und Anel A (2003). "Saturated free fatty acid release and intracellular ceramide generation during apoptosis induction are closely related processes." *Biochim Biophys Acta* **1634**(1-2): 40-51.
- Izquierdo L, Nakanishi M, Mehlert A, Machray G, Barton GJ und Ferguson MA (2009). "Identification of a glycosylphosphatidylinositol anchor-modifying beta1-3 N-acetylglucosaminyl transferase in *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **71**(2): 478-491.
- Jedd G, Mulholland JW und Segev N (1997). "Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment." *J Cell Biol* **137**(3): 563-580.
- Jeffries TR, Morgan GW und Field MC (2001). "A developmentally regulated rab11 homologue in *Trypanosoma brucei* is involved in *recycling* processes." *J Cell Sci* **114**(Pt 14): 2617-2626.
- Johnson JG und Cross GA (1979). "Selective cleavage of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*." *Biochem J* **178**(3): 689-697.
- Jones D, Mehlert A und Ferguson M (2004). "The N-glycan glucosidase system in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Soc Trans*.
- Jones NG, Nietlispach D, Sharma R, Burke DF, Eyres I, Mues M, Mott HR und Carrington M (2008). "Structure of a glycosylphosphatidylinositol-anchored domain from a trypanosome variant surface glycoprotein." *J Biol Chem* **283**(6): 3584-3593.
- Jones S, Newman C, Liu F und Segev N (2000). "The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4403-4411.
- Jones TW und Dávila AM (2001). "*Trypanosoma vivax*--out of Africa." *Trends Parasitol* **17**(2): 99-101.
- Jordan AM (1976). "Tsetse flies as vectors of trypanosomes." *Vet Parasitol* **2**(1): 143-152.



- Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J und Truc P (2005). "Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report." *Am J Trop Med Hyg* **73**(3): 491-495.
- Kabayo JP (2002). "Aiming to eliminate tsetse from Africa." *Trends Parasitol* **18**(11): 473-475.
- Kamiya Y, Kamiya D, Yamamoto K, Nyfeler B, Hauri HP und Kato K (2008). "Molecular Basis of Sugar Recognition by the Human L-type Lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36." *J Biol Chem* **283**(4): 1857-1861.
- Kay LL, Ronan R, Schaefer EJ und Brewer HB (1982). "Tangier disease: a structural defect in apolipoprotein A-I (apoA-I Tangier)." *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(8): 2485-2489.
- Kelleher D (2005). "An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase." *Glycobiology* **16**(4): 47R-62R.
- Kelley RJ, Alexander DL, Cowan C, Balber AE und Bangs JD (1999). "Molecular cloning of p67, a lysosomal membrane glycoprotein from *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **98**(1): 17-28.
- Kiernan JA (2000). "Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do." *microscopy today*(00-1): 8-12.
- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J und Hannun YA (2008). "The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling." *Cell Signal* **20**(6): 1010-1018.
- Kohl L, Robinson D und Bastin P (2003). "Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes." *The EMBO Journal* **22**(20): 5336-5346.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM und Cabib E (1997). "Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin." *J Biol Chem* **272**(28): 17762-17775.
- Kornfeld S (1992). "Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors." *Annu Rev Biochem* **61**: 307-330.
- Kyhse-Andersen J (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-209.
- LaCount DJ, Bruse S, Hill KL und Donelson JE (2000). "Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters." *Mol Biochem Parasitol* **111**(1): 67-76.
- Lai DH, Hashimi H, Lun ZR, Ayala FJ und Lukes J (2008). "Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*." *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(6): 1999-2004.
- Laird PW (1989). "Trans splicing in trypanosomes--archaism or adaptation?" *Trends Genet* **5**(7): 204-208.
- Lancien J (1991). "[Campaign against sleeping sickness in South-West Uganda by trapping tsetse flies]." *Annales de la Société belge de médecine tropicale* **71 Suppl 1**: 35-47.
- Lee JH, Nguyen TN, Schimanski B und Günzl A (2007). "Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIIH." *Eukaryotic Cell* **6**(4): 641-649.

- Lemansky P, Fatemi SH, Gorican B, Meyale S, Rossero R und Tartakoff AM (1990). "Dynamics and longevity of the glycolipid-anchored membrane protein, Thy-1." *J Cell Biol* **110**(5): 1525-1531.
- Lemmon SK und Traub LM (2000). "Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 457-466.
- Li H, Wang J, Mor G und Sklar J (2008). "A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells." *Science*.
- Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH und Mottram JC (2003). "Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8." *Mol Biol Cell* **14**(3): 1182-1194.
- Lipardi C, Nitsch L und Zurzolo C (2000). "Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting." *Molecular Biology of the Cell* **11**(2): 531-542.
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE und Englund PT (2005). "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." *Trends Parasitol* **21**(8): 363-369.
- Mackey ZB, O'Brien TC, Greenbaum DC, Blank RB und McKerrow JH (2004). "A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **279**(46): 48426-48433.
- Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ und Tabas I (1998). "Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling." *J Biol Chem* **273**(7): 4081-4088.
- Martinez-Menárguez JA, Prekeris R, Oorschot VM, Scheller R, Slot JW, Geuze HJ und Klumperman J (2001). "Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport." *J Cell Biol* **155**(7): 1213-1224.
- Matthews K (2005). "The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*." *Journal of Cell Science*.
- Mayor S, Presley JF und Maxfield FR (1993). "Sorting of membrane components from endosomes and subsequent *recycling* to the cell surface occurs by a bulk flow process." *J Cell Biol* **121**(6): 1257-1269.
- Mayor S, Rothberg KG und Maxfield FR (1994). "Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking." *Science* **264**(5167): 1948-1951.
- McConville MJ und Ferguson MA (1993). "The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes." *Biochem J* **294** ( Pt 2): 305-324.
- McKean PG (2003). "Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*." *Curr Opin Microbiol* **6**(6): 600-607.
- Mehlert A, Richardson JM und Ferguson MA (1998a). "Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of a class-2 variant surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*." *J Mol Biol* **277**(2): 379-392.

- Mehlert A, Zitzmann N, Richardson JM, Treumann A und Ferguson MA (1998b). "The glycosylation of the variant surface glycoproteins and procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 145-152.
- Metcalf P, Blum M, Freymann D, Turner M und Wiley DC (1987). "Two variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* of different sequence classes have similar 6 Å resolution X-ray structures." *Nature* **325**(6099): 84-86.
- Michels PA, Bringaud F, Herman M und Hannaert V (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1463-1477.
- Miller EA (2007). "Vesicle tethering: TRAPPING transport carriers." *Curr Biol* **17**(6): R211-213.
- Möller S, Croning MD und Apweiler R (2001). "Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions." *Bioinformatics* **17**(7): 646-653.
- Moloo SK, Orinda GO, Sabwa CL, Minja SH und Masake RA (1999). "Study on the sequential tsetse-transmitted *Trypanosoma congolense*, *T. brucei brucei* and *T. vivax* infections to African buffalo, eland, waterbuck, N'Dama and Boran cattle." *Vet Parasitol* **80**(3): 197-213.
- Morgan GW, Goulding D und Field MC (2004). "The Single Dynamin-like Protein of *Trypanosoma brucei* Regulates Mitochondrial Division and Is Not ...." *Journal of Biological Chemistry*.
- Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Carrington M und Field MC (2002). "The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences." *Trends Parasitol* **18**(11): 491-496.
- Morrison LJ, Tweedie A, Black A, Pinchbeck GL, Christley RM, Schoenefeld A, Hertz-Fowler C, Macleod A, Turner CM und Tait A (2009). "Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*." *PLoS ONE* **4**(5): e5564.
- Morsomme P, Prescianotto-Baschong C und Riezman H (2003). "The ER v-SNAREs are required for GPI-anchored protein sorting from other secretory proteins upon exit from the ER." *J Cell Biol* **162**(3): 403-412.
- Mottram JC, North MJ, Barry JD und Coombs GH (1989). "A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension." *FEBS Lett* **258**(2): 211-215.
- Mouratou B, Biou V, Joubert A, Cohen J, Shields DJ, Geldner N, Jürgens G, Melançon P und Cherfils J (2005). "The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf." *BMC Genomics* **6**(1): 20.
- Moussalli M, Pipe SW, Hauri HP, Nichols WC, Ginsburg D und Kaufman RJ (1999). "Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII." *J Biol Chem* **274**(46): 32539-32542.
- Moyersoen J, Choe J, Kumar A, Voncken FG, Hol WG und Michels PA (2003). "Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins." *Eur J Biochem* **270**(9): 2059-2067.

- Msangi AR, Whitaker CJ und Lehane MJ (1998). "Factors influencing the prevalence of trypanosome infection of *Glossina pallidipes* on the Ruvu flood plain of Eastern Tanzania." *Acta Trop* **70**(2): 143-155.
- Munford RS, Sheppard PO und O'Hara PJ (1995). "Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure." *J Lipid Res* **36**(8): 1653-1663.
- Muñiz M, Nuoffer C, Hauri HP und Riezman H (2000). "The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles." *J Cell Biol* **148**(5): 925-930.
- Munoz-Jordan JL, Davies KP und Cross GAM (1996). "Stable Expression of Mosaic Coats of Variant Surface Glycoproteins in *Trypanosoma brucei*." *Science's SAGE KE*.
- Mussmann R, Engstler M, Gerrits H, Kieft R, Toaldo CB, Onderwater J, Koerten H, van Luenen HG und Borst P (2004). "Factors affecting the level and localization of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **279**(39): 40690-40698.
- Mussmann R, Janssen H, Calafat J und Engstler M (2003). "The expression level determines the surface distribution of the transferrin receptor in *Trypanosoma* ...." *Molecular Microbiology*.
- Nasab FP, Schulz BL, Gamarro F, Parodi AJ und Aebi M (2008). "All in one: *Leishmania major* STT3 proteins substitute for the whole oligosaccharyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **19**(9): 3758-3768.
- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Moussalli MJ, Hauri HP, Ciavarella N, Kaufman RJ und Ginsburg D (1998). "Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII." *Cell* **93**(1): 61-70.
- Nilsson I, Kelleher DJ, Miao Y, Shao Y, Kreibich G, Gilmore R, von Heijne G und Johnson AE (2003). "Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex." *J Cell Biol* **161**(4): 715-725.
- Nok AJ (2003). "Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis." *Parasitol Res* **90**(1): 71-79.
- Nolan DP, Jackson DG, Biggs MJ, Brabazon ED, Pays A, Van Laethem F, Paturiaux-Hanocq F, Elliott JF, Elliot JF, Voorheis HP und Pays E (2000). "Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **275**(6): 4072-4080.
- Nyfeler B, Reiterer V, Wendeler MW, Stefan E, Zhang B, Michnick SW und Hauri HP (2008). "Identification of ERGIC-53 as an intracellular transport receptor of alpha1-antitrypsin." *The Journal of Cell Biology* **180**(4): 705-712.
- Nyfeler B, Zhang B, Ginsburg D, Kaufman RJ und Hauri HP (2006). "Cargo selectivity of the ERGIC-53/MCFD2 transport receptor complex." *Traffic* **7**(11): 1473-1481.
- O'Beirne C, Lowry CM und Voorheis HP (1998). "Both IgM and IgG anti-VSG antibodies initiate a cycle of aggregation-disaggregation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* without damage to the parasite." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 165-193.
- Ogbadoyi EO, Robinson DR und Gull K (2003). "A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes." *Molecular Biology of the Cell* **14**(5): 1769-1779.

- Oppeerdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ und Misset O (1984). "Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*." *J Cell Biol* **98**(4): 1178-1184.
- Oppeerdoes FR und Borst P (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." *FEBS Lett* **80**(2): 360-364.
- Oppeerdoes FR, Borst P, Bakker S und Leene W (1977). "Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD<sup>+</sup>-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form to *Trypanosoma brucei*." *Eur J Biochem* **76**(1): 29-39.
- Orlean P und Menon AK (2007). "Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids." *J Lipid Res* **48**(5): 993-1011.
- Overath P und Engstler M (2004). "Endocytosis, membrane *recycling* and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system." *Mol Microbiol* **53**(3): 735-744.
- Overath P, Stierhof YD und Wiese M (1997). "Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket." *Trends Cell Biol* **7**(1): 27-33.
- Pal A, Hall BS und Field MC (2002a). "Evidence for a non-LDL-mediated entry route for the trypanocidal drug suramin in *Trypanosoma brucei*." *Molecular & Biochemical Parasitology*.
- Pal A, Hall BS, Nesbeth DN, Field HI und Field MC (2002b). "Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway." *J Biol Chem* **277**(11): 9529-9539.
- Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L und Zurzolo C (2004). "Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins." *J Cell Biol* **167**(4): 699-709.
- Palenchar JB, Liu W, Palenchar PM und Bellofatto V (2006). "A divergent transcription factor TFIIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability." *Eukaryotic Cell* **5**(2): 293-300.
- Pamer EG, So M und Davis CE (1989). "Identification of a developmentally regulated cysteine protease of *Trypanosoma brucei*." *Molecular and biochemical parasitology* **33**(1): 27-32.
- Parodi AJ (1998). "The quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, a trip from trypanosomes to mammals." *Braz J Med Biol Res* **31**(5): 601-614.
- Parodi AJ, Lederkremer GZ und Mendelzon DH (1983). "Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharides." *J Biol Chem* **258**(9): 5589-5595.
- Paturiaux-Hanocq F, Zitzmann N, Hanocq-Quertier J, Vanhamme L, Rolin S, Geuskens M, Ferguson MA und Pays E (1997). "Expression of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma gambiense* in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* shows that the cell type dictates the nature of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attached to the glycoprotein." *Biochem J* **324** ( Pt 3): 885-895.



- Paulnock DM und Collier SP (2001). "Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis." *J Leukoc Biol* **69**(5): 685-690.
- Pays E (2006). "The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes." *Microbes and Infection*.
- Pays E, Vanhamme L und Berberof M (1994). "Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes." *Annu Rev Microbiol* **48**: 25-52.
- Peacock L, Ferris V, Bailey M und Gibson W (2009). "Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*." *Parasit Vectors* **2**(1): 43.
- Penchenier L, Alhadji D, Bahébégué S, Simo G, Laveissière C und Cuny G (2005). "Spontaneous cure of domestic pigs experimentally infected by *Trypanosoma brucei* gambiense. Implications for the control of sleeping sickness." *Vet Parasitol* **133**(1): 7-11.
- Peplowska K, Cabrera M und Ungermann C (2008). "UVRAG reveals its second nature." *Nat Cell Biol* **10**(7): 759-761.
- Peplowska K, Markgraf DF, Ostrowicz CW, Bange G und Ungermann C (2007). "The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis." *Dev Cell* **12**(5): 739-750.
- Peterson MR und Emr SD (2001). "The Class C Vps Complex Functions at Multiple Stages of the Vacuolar Transport Pathway." *Traffic*.
- Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S und Futerman AH (2006). "When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights ...." *Journal of Biological Chemistry*.
- Pfeffer S und Aivazian D (2004). "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 886-896.
- Picozzi K, Fèvre EM, Odiit M, Carrington M, Eisler MC, Maudlin I und Welburn SC (2005). "Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases." *BMJ* **331**(7527): 1238-1241.
- Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO und Gull K (1999). "Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis." *J Cell Sci* **112** ( Pt 24): 4641-4650.
- Popoff V, Mardones G, Tenza D, Rojas R, Lamaze C, Bonifacino J, Raposo G und Johannes L (2007). "The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site." *Journal of Cell Science* **120**(12): 2022-2031.
- Price HP, Goulding D und Smith DF (2005). "ARL1 has an essential role in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 643-645.
- Puoti A und Conzelmann A (1993). "Characterization of abnormal free glycoposphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H." *J Biol Chem* **268**(10): 7215-7224.
- Radwanska M, Magez S, Dumont N, Pays A, Nolan DP und Pays E (2000). "Antibodies raised against the flagellar pocket fraction of *Trypanosoma brucei* preferentially recognize HSP60 in cDNA expression library." *Parasite Immunol* **22**(12): 639-650.



- Ragni E, Fontaine T, Gissi C, Latgè JP und Popolo L (2007). "The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis." *Yeast* **24**(4): 297-308.
- Ralton JE und McConville MJ (1998). "Delineation of three pathways of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania mexicana*. Precursors from different pathways are assembled on distinct pools of phosphatidylinositol and undergo fatty acid remodeling." *J Biol Chem* **273**(7): 4245-4257.
- Reggiori F, Canivenc-Gansel E und Conzelmann A (1997). "Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*." *The EMBO Journal* **16**(12): 3506-3518.
- Reid SA (2002). "Trypanosoma evansi control and containment in Australasia." *Trends Parasitol* **18**(5): 219-224.
- Reuner B, Vassella E, Yutzy B und Boshart M (1997). "Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture." *Mol Biochem Parasitol* **90**(1): 269-280.
- Rieder SE und Emr SD (1997). "A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole." *Mol Biol Cell* **8**(11): 2307-2327.
- Rifkin MR (1978). "Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci USA* **75**(7): 3450-3454.
- Roberts WL, Myher JJ, Kuksis A, Low MG und Rosenberry TL (1988). "Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C." *J Biol Chem* **263**(35): 18766-18775.
- Roberts WL und Rosenberry TL (1985). "Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase." *Biochem Biophys Res Commun* **133**(2): 621-627.
- Robinson DR, Sherwin T, Ploubidou A, Byard EH und Gull K (1995). "Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle." *J Cell Biol* **128**(6): 1163-1172.
- Roditi I und Clayton C (1999). "An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **103**(1): 99-100.
- Roditi I, Furger A, Ruepp S, Schürch N und Bütikofer P (1998). "Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 117-130.
- Roditi I, Schwarz H, Pearson TW, Beecroft RP, Liu MK, Richardson JP, Bühring HJ, Pleiss J, Bülow R und Williams RO (1989). "Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*." *J Cell Biol* **108**(2): 737-746.
- Rojas R, Kametaka S, Haft CR und Bonifacino JS (2007). "Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors." *Mol Cell Biol* **27**(3): 1112-1124.

- Rojas R, Van Vlijmen T, Mardones G, Prabhu Y, Rojas A, Mohammed S, Heck A, Raposo G, Van Der Sluijs P und Bonifacino J (2008). "Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7." *The Journal of Cell Biology* **183**(3): 513-526.
- Rolli E, Ragni E, Calderon J, Porello S, Fascio U und Popolo L (2009). "Immobilization of the Glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 Protein into the Chitin Ring and Septum Is Required for Proper Morphogenesis in Yeast." *Molecular Biology of the Cell*.
- Rubotham J, Woods K, Garcia-Salcedo JA, Pays E und Nolan DP (2005). "Characterization of two protein disulfide isomerases from the endocytic pathway of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*." *J Biol Chem* **280**(11): 10410-10418.
- Sacher M, Barrowman J, Schieltz D, Yates JR und Ferro-Novick S (2000). "Identification and characterization of five new subunits of TRAPP." *Eur J Cell Biol* **79**(2): 71-80.
- Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M und Ferro-Novick S (2001). "TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport." *Mol Cell* **7**(2): 433-442.
- Sambrook J, Fritsch E und Maniatis T (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 2nd ed.*(N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sant'Anna C, Campanati L, Gadelha C, Lourenço D, Labati-Terra L, Bittencourt-Silvestre J, Benchimol M, Cunha-e-Silva NL und De Souza W (2005). "Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM)." *Histochem Cell Biol* **124**(1): 87-95.
- Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L und Zurzolo C (2002). "PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts." *Traffic* **3**(11): 810-821.
- Schimanski B, Brandenburg J, Nguyen TN, Caimano MJ und Günzl A (2006). "A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*." *Nucleic Acids Research* **34**(6): 1676-1684.
- Schimanski B, Nguyen TN und Günzl A (2005). "Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*." *Molecular and Cellular Biology* **25**(16): 7303-7313.
- Schwartz KJ, Peck RF, Tazeh NN und Bangs JD (2005). "GPI valence and the fate of secretory membrane proteins in African trypanosomes." *J Cell Sci* **118**(Pt 23): 5499-5511.
- Schweizer A, Fransen JA, Bächli T, Ginsel L und Hauri HP (1988). "Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus." *J Cell Biol* **107**(5): 1643-1653.
- Seaman MN (2005). "Recycle your receptors with retromer." *Trends Cell Biol* **15**(2): 68-75.
- Shaw APM (2004). "Economics of African trypanosomiasis." *The trypanosomiasis (eds. I. Maudlin, P.H. Holmes & M.A. Miles)*: 614.

- Shegokar VR, Powar RM, Joshi PP, Bhargava A, Dani VS, Katti R, Zare VR, Khanande VD, Jannin J und Truc P (2006). "Short report: Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population." *Am J Trop Med Hyg* **75**(5): 869-870.
- Sherwin T und Gull K (1989). "The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations." *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **323**(1218): 573-588.
- Shima DT, Scales SJ, Kreis TE und Pepperkok R (1999). "Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes." *Curr Biol* **9**(15): 821-824.
- Siegel TN, Tan KSW und Cross GAM (2005). "Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*." *Molecular and Cellular Biology*.
- Sillence DJ (2001). "Apoptosis and signalling in acid sphingomyelinase deficient cells." *BMC Cell Biol* **2**: 24.
- Simo G, Asonganyi T, Nkinin SW, Njiokou F und Herder S (2006). "High prevalence of *Trypanosoma brucei* gambiense group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon." *Vet Parasitol* **139**(1-3): 57-66.
- Sleat DE, Wang Y, Sohar I, Lackland H, Li Y, Li H, Zheng H und Lobel P (2006). "Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins." *Mol Cell Proteomics* **5**(10): 1942-1956.
- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J und Zerial M (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the *recycling* pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." *J Cell Biol* **149**(4): 901-914.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL und Panigrahi AK (2005). "Complex management: RNA editing in trypanosomes." *Trends in Biochemical Sciences* **30**(2): 97-105.
- Sütterlin C, Doering TL, Schimmöller F, Schröder S und Riezman H (1997). "Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast." *J Cell Sci* **110** ( Pt 21): 2703-2714.
- Tazeh NN und Bangs JD (2007). "Multiple Motifs Regulate Trafficking of the LAMP-Like Protein p67 in the Ancient Eukaryote *Trypanosoma brucei*." *Traffic*.
- Timms MW, van Deursen FJ, Hendriks EF und Matthews KR (2002). "Mitochondrial development during life cycle differentiation of African trypanosomes: evidence for a kinetoplast-dependent differentiation control point." *Molecular Biology of the Cell* **13**(10): 3747-3759.
- Treumann A, Zitzmann N, Hülsmeier A, Prescott AR, Almond A, Sheehan J und Ferguson MA (1997). "Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of *Trypanosoma brucei*." *J Mol Biol* **269**(4): 529-547.
- Triggs VP und Bangs JD (2003). "Glycosylphosphatidylinositol-dependent protein trafficking in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*." *Eukaryot Cell*.
- Tse AG, Barclay AN, Watts A und Williams AF (1985). "A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes." *Science* **230**(4729): 1003-1008.

- Turner CM und Barry JD (1989). "High frequency of antigenic variation in *Trypanosoma brucei* rhodesiense infections." *Parasitology* **99 Pt 1**: 67-75.
- Turner CM, Barry JD, Maudlin I und Vickerman K (1988). "An estimate of the size of the metacyclic variable antigen repertoire of *Trypanosoma brucei* rhodesiense." *Parasitology* **97 ( Pt 2)**: 269-276.
- Tyler KM (1997). "The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers." *Proceedings: Biological Sciences*.
- Tyler KM und Engman DM (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." *Int J Parasitol* **31**(5-6): 472-481.
- Ullu E, Matthews KR und Tschudi C (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." *Molecular and Cellular Biology* **13**(1): 720-725.
- Urwyler S, Studer E, Renggli CK und Roditi I (2007). "A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **63**(1): 218-228.
- Vagin O, Kraut JA und Sachs G (2009). "Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia." *Am J Physiol Renal Physiol* **296**(3): F459-469.
- van der Blik AM und Meyerowitz EM (1991). "Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular ...." *nature.com*.
- van Hellemond JJ, Opperdoes FR und Tielens AG (2005). "The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 967-971.
- Vanhamme L und Pays E (1998). "Controls of the expression of the Vsg in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 107-116.
- Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Van Den Abbeele J, Pays A, Tebabi P, Van Xong H, Jacquet A, Moguilevsky N, Dieu M, Kane JP, De Baetselier P, Brasseur R und Pays E (2003). "Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum." *Nature* **422**(6927): 83-87.
- Vanhollebeke B, Nielsen MJ, Watanabe Y, Truc P, Vanhamme L, Nakajima K, Moestrup SK und Pays E (2007). "Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum." *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(10): 4118-4123.
- Vassella E, Acosta-Serrano A, Studer E, Lee SH, Englund PT und Roditi I (2001). "Multiple procyclin isoforms are expressed differentially during the development of insect forms of *Trypanosoma brucei*." *J Mol Biol* **312**(4): 597-607.
- Vassella E, Oberle M, Urwyler S, Renggli CK, Studer E, Hemphill A, Fragoso C, Bütikofer P, Brun R und Roditi I (2009). "Major surface glycoproteins of insect forms of *Trypanosoma brucei* are not essential for cyclical transmission by tsetse." *PLoS ONE* **4**(2): e4493.
- Vassella E, Straesser K und Boshart M (1997). "A mitochondrion-specific dye for multicolour fluorescent imaging of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **90**(1): 381-385.
- Vaughan S und Gull K (2008). "The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 3): 421-424.

- Vickerman K, Tetley L, Hendry KA und Turner CM (1988). "Biology of African trypanosomes in the tsetse fly." *Biol Cell* **64**(2): 109-119.
- Vollenweider F, Kappeler F, Itin C und Hauri HP (1998). "Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme." *J Cell Biol* **142**(2): 377-389.
- Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, Juma KG, Dyck VA, Msangi AR, Mkonyi PA und Feldmann HU (2000). "Glossina austeni (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique." *J Econ Entomol* **93**(1): 123-135.
- Wang W, Sacher M und Ferro-Novick S (2000a). "TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p." *J Cell Biol* **151**(2): 289-296.
- Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE und Goldenring JR (2000b). "Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25." *J Biol Chem* **275**(37): 29138-29146.
- Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ und Cullen PJ (2007). "A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer." *J Cell Sci* **120**(Pt 1): 45-54.
- Waters MG, Serafini T und Rothman JE (1991). "'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles." *Nature* **349**(6306): 248-251.
- Webster P und Russell DG (1993). "The flagellar pocket of trypanosomatids." *Parasitol Today (Regul Ed)* **9**(6): 201-206.
- Weise F, Stierhof YD, Kühn C, Wiese M und Overath P (2000). "Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite Leishmania, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells." *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4587-4603.
- Welburn SC, Fèvre EM, Coleman PG, Odiit M und Maudlin I (2001a). "Sleeping sickness: a tale of two diseases." *Trends Parasitol* **17**(1): 19-24.
- Welburn SC, Picozzi K, Fèvre EM, Coleman PG, Odiit M, Carrington M und Maudlin I (2001b). "Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene." *Lancet* **358**(9298): 2017-2019.
- Wettestad FR, Hawkins SF, Stewart A, Luzio JP, Howard JC und Jackson AP (2002). "Controlled elimination of clathrin heavy-chain expression in DT40 lymphocytes." *Science* **297**(5586): 1521-1525.
- WHO (1998). "Control and surveillance of African trypanosomiasis, report of WHO expert committee." *World Health Org Tech Rep Ser* **881**: 1-114.
- WHO (2006). "Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update." *Weekly epidemiological record* **81**(8): 69-80.
- Wickstead B, Ersfeld K und Gull K (2004). "The small chromosomes of Trypanosoma brucei involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes." *Genome Res* **14**(6): 1014-1024.



- Wirtz E, Hartmann C und Clayton C (1994). "Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes." *Nucleic Acids Res* **22**(19): 3887-3894.
- Wirtz E, Hoek M, Cross GAM und Journals O (1998). "Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*." *Nucleic Acids Research* **26**(20): 4626-4634.
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C und Cross GA (1999). "A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **99**(1): 89-101.
- Wissinger B, Brennicke A und Schuster W (1992). "Regenerating good sense: RNA editing and trans splicing in plant mitochondria." *Trends Genet* **8**(9): 322-328.
- Woolhouse ME, Bealby K, McNamara JJ und Silutongwe J (1994). "Trypanosome infections of the tsetse fly *Glossina pallidipes* in the Luangwa Valley, Zambia." *Int J Parasitol* **24**(7): 987-993.
- Wurmser AE, Sato TK und Emr SD (2000). "New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion." *J Cell Biol* **151**(3): 551-562.
- Xong HV, Vanhamme L, Chamekh M, Chimfwembe CE, Van Den Abbeele J, Pays A, Van Meirvenne N, Hamers R, De Baetselier P und Pays E (1998). "A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*." *Cell* **95**(6): 839-846.
- Zhang XM, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA und Rowe T (2004). "Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells." *J Biol Chem* **279**(41): 43027-43034.
- Ziegelbauer K, Stahl B, Karas M, Stierhof YD und Overath P (1993). "Proteolytic release of cell surface proteins during differentiation of *Trypanosoma brucei*." *Biochemistry* **32**(14): 3737-3742.
- Zitzmann N, Mehlert A, Carrouée S, Rudd PM, Ferguson MA und Carroué S (2000). "Protein structure controls the processing of the N-linked oligosaccharides and glycosylphosphatidylinositol glycans of variant surface glycoproteins expressed in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." *Glycobiology* **10**(3): 243-249.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
BSF	Blutstromformen
CCV	clathrinbedeckte Vesikel
CHC	schwere Kette von Clathrin (clathrin heavy chain)
ddH <sub>2</sub> O	<i>double distilled</i> H <sub>2</sub> O
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	<i>detergent-resistant membrane microdomain</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERES	ER <i>exit site</i>
ESAG	<i>expression site associated gene</i>
FAZ	<i>flagellar attachment zone</i>
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
h	Stunden
HAT	<i>human african trypanosomiasis</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>ls</i>	<i>long slender</i>
(m/v)	Masse-zu-Volumen (Kürzel bei Prozentangaben)
(v/v)	Volumen-zu-Volumen (Kürzel bei Prozentangaben)
M-VSG	metacyclic variable surface glycoprotein
M1.2	MITat 1.2
M1.6	MITat 1.6
Man	Mannose
Mc-HMI9	Methylcellulose-HMI9
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MVB	<i>multivesicular body</i>
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCF	prozyklische Formen
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA-Interferenz
SCoP	<i>structural classification of proteins</i>
sec	Sekunde
SIF	<i>stumpy inducing factor</i>
SMART	<i>simple modular architecture research tool</i>
SRA-Gen	<i>serum resistance-associated gene</i>
ss	<i>short stumpy</i>
TBS	TRIS buffered saline
TDB	<i>Trypanosoma dilution buffer</i>
TLF	<i>trypanosome lytic factor</i>
TRAPP	<i>trafficking protein particle</i>
UTR	nicht translatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
VSG	<i>variable surface glycoprotein</i>
z	Zellen

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich den materiellen Inhalt der vorliegenden Arbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Fakten, sofern sie nicht wissenschaftliches Allgemeingut sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, der 16.7.2010

Mark Günzel

## 9. Lebenslauf

### I Persönliche Angaben

Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsdatum	19.04.1974
Geburtsort	Lemgo/Lippe
Familienstand	Ledig / in fester Beziehung

### II Schulbildung

1980 bis 1984	Besuch der Grundschule in Lage/Ehrentrup
1984 bis 1993	Besuch des Gymnasiums Werreanger in Lage/Lippe Allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote 1,6)

### III Hochschulstudium

1994 bis 1999	Diplomstudium Biochemie an der Universität Leipzig
Feb 1998 bis Juni 1998	Auslandssemester im Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes an der Cardiff University in Cardiff/Wales Diplomprüfung mit den Schwerpunktfächern Biochemie, Organische Chemie, Mikrobiologie und Biotechnologie
Juli 1999	Abschluss des Studiums mit der Diplomarbeit "Die Expression des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten im unbeeinflussten Rattenhirn und nach totaler Immunolösung mittels 192IgG-Saporin" auf dem Gebiet der Neurochemie

### IV Promotion

1999 bis Jan 2002	Beginn der Promotion bei Prof Dr M Boshart an der FU Berlin Thema: "Charakterisierung des Transportweges von GPI-verankerten Proteinen in <i>T. brucei</i> mittels RNA-Interferenz"
Feb 2002 bis Dez 2003	Fortführung der Arbeit an der LMU München
2004 bis Juni 2006	Vorübergehendes Aussetzen der Promotion
Juli 2006 bis Juni 2010	Fortführung der Promotion bei Prof Dr Engstler an der TU Darmstadt mit gleichem Thema

## Danksagung

Markus möchte ich für die Themenstellung und für die Betreuung der Arbeit danken. Ich schätze die Basis unserer Zusammenarbeit sehr, welche sich in Konsens & Dissens bewährt hat.

Gerhard Thiel möchte ich dafür danken, dass er die Zweitkorrektur dieser Arbeit so selbstverständlich übernommen hat.

Ganz besonders möchte ich Nicola Jones und Susanne Kramer danken, für ihr Kollegialität und vor allem - ungleich wichtiger - für ihre Freundschaft. Wir haben einen guten Weg miteinander zurückgelegt.

Niko Heddergott, Andi Hartl, Christopher Batram und Jamin Jung möchte ich für die Zusammenarbeit und all die liebenswerten Eigenheiten danken. Jedem auf seine Weise - ich sag nur Freitagskippen... und natürlich sind hier auch die ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe zu erwähnen.

Anne Lehmkuhl möchte ich dafür danken, dass sie - abgesehen von wunderbarer Arbeit - mir doch den Blick auf einige blinde Flecke eröffnet hat. Die Betreuung war eine schöne Herausforderung für mich. Danke.

Sigrid Eilhardt, Larissa Ivanowa und Sabine Kaiser möchte ich für die technische Assistenz im Labor danken. Es bleiben schöne Erinnerung an alte Kochplatten, aufgenötigte Äpfel und die Deckelüberprüfung der Stickstofftanks.

Und weil wir gerade dabei sind - stellvertretend für so viele, die doch wichtig waren im Prozess dieser Arbeit, vielen Dank an Carsten Krumbholz für die langjährige Freundschaft, die sogar die Laborarbeit überstanden hat.

Für Korrekturlesen und wunderbare Gespräche in Deutschland und Catan möchte ich Sabrina Fröls, Cordula Böhm und Andi Veith danken - wann kommt Ihr wieder nach Berlin?

Ebenfalls danken möchte ich Bertram Reber für seine Unterstützung und seine Zuversicht. Das Rückenfreihalten war ein großes Geschenk.

Julius Kübler möchte ich für seine Offenheit und Diskussionsfreude danken. Ich habe selten jemanden mit so wenigen Berührungsängsten gegenüber Wissenschaftssprache erlebt.

Helga Moldzio möchte ich dafür danken, an einem kritischen Punkt der Arbeit für mich dagewesen zu sein - vielen Dank.

Zuguterletzt möchte ich noch meine Mutter erwähnen: ab jetzt müssen wir wohl die echten Mantel-und-Degen-Filme gucken...

*Nenikékamen*